

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

**Agentes de fermentación y crianza de los mostos y vinos de
Montilla y los Moriles**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Víctor Arroyo Varela

DIRECTOR:

Íñigo Leal

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5326699132

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

T1
S77.1
ARR

AGENTES DE FERMENTACION Y CRIANZA
DE LOS MOSTOS Y VINOS DE MONTILLA
Y LOS MORILES

b16215357
i37577505

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro ...33601.....

Tesis doctoral

VICTOR ARROYO VARELA

Departamento de Fermentaciones

Industriales del Patronato

"Juan de la Cierva".

Quiero expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. D. Manuel LORA TAMAYO, que presenta y apadrina esta Tesis.

Al Dr. Don José GARRIDO MARQUEZ, Director del Departamento de Fermentaciones Industriales, donde se ha realizado con el material y medios necesarios.

Al Dr. Don Baldomero IÑIGO LEAL por su constante y acertada dirección.

A todos mis compañeros, especialmente a David VAZQUEZ MARTINEZ y Concepción LLAGUNO MARCHENA, por la gran ayuda recibida.

A Alvear S.A. y Cruz Conde S.A. que dieron toda clase de facilidades para la toma de muestras al comienzo del trabajo y que actualmente realizan elaboraciones con levaduras seleccionadas en el transcurso del mismo.

INDICE

	<u>Página</u>
PROLOGO	1
CARACTERISTICAS VITIVINICOLAS DE LA ZONA	3
Terreno y clima	4
Viñedos	4
Elaboración del vino	5
Producción y valor	11

PRIMERA PARTE

MICROBIOLOGIA DE LA FERMENTACION	13
Antecedentes Históricos	14
Antecedentes Bibliográficos	18
Aislamiento e identificación de las levaduras	32
Técnica de la toma de muestras y aislamiento	33
Técnica de la identificación de especies ...	36
Examen microscópico	36
Examen de ramificaciones pseudomiceliales ..	37
Caracteres de los cultivos sobre agar-malta y mosto de uva	37
Punción en gelatina-mosto	37
Esporificación	38
Asimilación de nitratos	38
Fermentación de azúcares	38

	<u>Página</u>
Desarrollo en presencia de etanol.....	38
Escisión de arbutina.....	39
Asimilación de azúcares.....	39
Poder fermentativo y producción de acidez volátil.....	39
Primer Cuadro General.....	41
Las especies aisladas.....	50
Descripción de las especies aisladas.....	51
Comentario.....	64
 SELECCION DE CEPAS PARA SU APLICACION INDUSTRIAL	73
Comentario.....	82
 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA FERMENTACION ES- CALAR Y LA FERMENTACION EN PUREZA.....	83
Comentario.....	94
Procedimientos analíticos.....	107

SEGUNDA PARTE

MICROBIOLOGIA DE LOS VELOS DESARROLLADOS SO- BRE VINOS.....	108
Antecedentes bibliográficos.....	109
Las especies aisladas.....	112
Descripción de las especies aisladas.....	113
Segundo Cuadro General.....	123
Comentario.....	127

Página

SELECCION DE CEPAS PARA SU APLICACION INDUS-	
TRIAL.....	134
Comentario.....	135
 ESTUDIO DE LAS LEVADURAS FILMOGENAS Y NO -	
FILMOGENAS A 15° ALCOHOLICOS, COMO AGENTES	
DE FERMENTACION.....	138
Comentario.....	148
 ESTUDIO DE LAS LEVADURAS FILMOGENAS A 15°	
ALCOHOLICOS, EN FASE DE VELO.....	149
Comentario.....	164
 CONCLUSIONES.....	166
 BIBLIOGRAFIA.....	177

PROLOGO

Las investigaciones que se exponen en este trabajo continúan y tienden a completar los estudios iniciados en España por el insigne Profesor Marcilla y sus colaboradores que fueron los primeros en demostrar que los velos formados sobre los vinos de Montilla y Jerez estaban constituidos por levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* y no al género que entonces se llamaba *Mycodeima*, como creía entre otros Rocques. Este hecho despertó mucho interés entre los microbiólogos, como lo demuestran los sucesivos trabajos de Prostosserdov, De Castella, Shanderl y otros.

El Profesor Marcilla, en los Antecedentes de su trabajo sobre las levaduras que forman velo sobre vinos (44), decía: "Es preciso, para determinar si estas levaduras existen sobre el fruto y predominan o no en la fermentación espontánea de los mostos, procurar investigar la flora normal sobre los frutos y en las diversas fases de la fermentación, lo que supone un estudio largo y penoso, pero que deberá ser hecho alguna vez para las diversas zonas vitícolas y los distintos tipos de elaboración, si han de conseguirse reales progresos en la forma de conducir las fermentaciones en cada caso."

Nuestro estudio se ha extendido principalmente a la microbiología del proceso, tanto de las fases fermen-

tativas del mosto como de la posterior crianza del vino resultante. Se ha tomado en consideración la zona vitícola cuyo centro es Montilla y Los Moriles, aplicando a su estudio sistemático las técnicas y modalidades del - Profesor Castelli y su escuela de Perugia.

De estos estudios microbiológicos, ha resultado la identificación de una nueva especie que proponemos - con el nombre de *Saccharomyces montuliensis*.

Dado el carácter aplicativo que se imprime a estos trabajos se ha efectuado una selección ebtre todas las cepas de levaduras aisladas en fase fermentativa - con objeto de escoger aquellas que puedan ser ventajosamente usadas en la industria, realizándose con las mismas ensayos de fermentaciones controladas con miras a - recabar resultados de interés práctico.

Se han estudiado, desde un punto de vista fisiológico, las especies de levaduras aisladas en fase de - velo haciendo un estudio comparativo con especies aisladas en la tercera fase fermentativa tratando de ver su posible utilidad como agentes de fermentación y por úl-timo, se han seleccionado aquellas de positiva utilidad para la crianza del vino.

CARACTERISTICAS VITIVINICOLAS DE LA ZONA.

TERRENO Y CLIMA

La zona de Montilla y los Moriles, y con esta denominación quiere indicarse toda la región que geográficamente comprende la parte meridional de la provincia de Córdoba con los términos municipales de Montilla, Los Moriles, Aguilar de la Frontera, Lucena y Puente Genil, está formada por pequeñas colinas con terrenos de formación reciente, en su mayor parte de finales del período terciario, y constituido por margas compactas, principalmente, con un elevado contenido en caliza, especialmente en el famoso pago de Los Moriles. Los mejores para la producción de uva en cuanto a finura y calidad, son las "albarizas", tierras de color blanquecino, con un contenido del 30 al 50 por ciento en caliza y proporciones variables de arcilla y arena.

El clima es marcadamente continental, con inviernos crudos y veranos muy calurosos. Las lluvias son escasas, oscilando entre 400 y 500 mm anuales y repartidas principalmente en las estaciones de primavera y otoño.

VINEDOS

La uva, cultivada casi exclusivamente, es la llamada "Pedro Ximenez", oriunda del Rhin y que según es -

tradición fué traída por un soldado de este nombre de -
los tercios de Carlos V. Es de una redondez casi per-
fecta, y de piel translúcida y proporciona mostos muy -
dulces, extraordinariamente finos, de 13, 14 y hasta -
16° Bé, y poco ácidos, con menos de 4 gramos por litro
en ácido tartárico.

La cepa "Pedro Ximenez" es de porte bastante er
guido, hojas medianas o pequeñas, lampiñas, lobadas, -
con senos estrechos, racimos no muy grandes, algo ovales,
bastante apretados.

De la uva y por pasificación al sol, se obtienen
mostos afrutados de 30-32 grados Baumé que son muy apre-
ciados por sus aplicaciones en bodegas.

También, y como cepas secundarias que dan mostos
de menor grado de dulce, son cultivadas las cepas llama-
das "Baladí Verdejo", "Baladí", "Lairén" y "Moscatel".

ELABORACION DEL VINO

La vendimia en esta zona es bastante temprana y
generalmente tiene lugar en la primera quincena de sep-
tiembre. La recogida de la uva suele hacerse en dos o -
más vueltas con objeto de cortar solo el fruto maduro.-
Los racimos son transportados entonces a los lagares, don
de tiene lugar la pisa y prensada de los mismos para la
obtención de mostos que se procura resulten finísimos, -

utilizando los métodos tradicionales, aunque actualmente se están introduciendo nuevas técnicas con el empleo de maquinaria moderna.

El enyesado, consistente en añadir sulfato cálcico puro, espolvoreándolo sobre la uva sin haber sido pisada aún, es práctica también permitida por la Ley para los vinos de esta zona. Con el enyesado se consigue una disminución del pH de los vinos resultantes sin aumentar sensiblemente la acidez total, ayudando además - la presencia de iones calcio a la clarificación, que se verifica más rápidamente que en los vinos no enyesados.

También se está imponiendo actualmente el uso - del anhídrido sulfuroso en la vinificación. Su aplicación es cuidadosamente dosificada ya que si bien es cierto que el sulfuroso elimina aquellas levaduras que, debido a su metabolismo impuro, no resultan adecuadas para la fermentación y sin embargo es bien tolerado por - las más idóneas, también hay que tener en cuenta que estos vinos son, en su mayoría destinados a crianza y las levaduras que originan la "flor" toleran mal un exceso de este anhídrido con lo que el velo se desarrolla con manifiesta dificultad y puede llegar a no desarrollarse.

También es empleado el ácido tartárico para la corrección de la acidez de los mostos ya que estos, debido al extraordinario grado de madurez alcanzado por - la uva, resultan muy poco ácidos; sin embargo esta corrección es de poca cuantía dada la finura conque quie-

ren obtenerse los vinos.

Se utilizan para la fermentación conos o tinajas de cemento de 140 a 300 arrobas de capacidad, recipientes que por su gran volumen ofrecen ventajas de tipo económico y de manipulación. La temperatura del caldo en fermentación se eleva bastante pero las levaduras indígenas continúan su actuación incluso por encima de los 35 grados, sin que la fermentación se detenga. Esta elevada temperatura se traduce en mermas de líquido y en pérdidas de alcohol. Para evitarlas en parte, en muchas bodegas no se llenan las tinajas de una vez, sino en rellenos sucesivos, generalmente tres, con intervalos de varios días entre ellos, con el fin de detener por algunas horas la fermentación tumultuosa y refrescar el mosto.

Las tinajas, que están muy próximas entre sí, casi tocándose, se van rellenando alternadamente, esto es: primero las pares de cada hilera y cuando estas ya están llenas, se rellenan las impares, con objeto de favorecer la eliminación del calor producido. De todos modos, la temperatura suele alcanzar los 35 grados, porque siendo la vendimia muy temprana, el tiempo es todavía muy caluroso y son frecuentes las temperaturas ambientales de 25 grados, o más, en el interior de los lagares. El mosto entra en los conos a 23-25 grados en muchas ocasiones y siendo muy rico en azúcar, como hemos dicho, tiene lugar con gran rapidez una fermentación muy tumultuosa. Ade-

más, la adopción de precauciones está condicionada por la rapidez en la entrada de la uva y en el apogeo de la vendimia resulta difícil impedir la elevación de la temperatura.

Con respecto a la zona de Jerez, encontramos - aquí una diferencia fundamental y es que en esta región los mostos fermentan en botas de 30 arrobas con lo que dado este pequeño volumen, y el suave clima otoñal no se producen las elevaciones de temperatura tan frecuentes en Montilla. Una vez efectuado el deslio, estas mismas botas son las que se usan en la crianza.

Concluida, pues, la fermentación, el deslio se realiza de enero a marzo y según el tipo de vino obtenido es destinado a las distintas elaboraciones posteriores.

Normalmente, los vinos quedan secos pero no es infrecuente que queden con algo de azúcar sin consumir, "abocados", esto sin embargo no es un grave inconveniente sino que más bien una ligera ventaja dado que estas mínimas cantidades de azúcar son rápidamente metabolizadas por las mismas levaduras que originan los velos, desarrollándose éstos con gran rapidez.

Los vinos, que por sus características son destinados a "finos", son encabezados, si lo precisan, - con alcohol de gran calidad hasta elevar su contenido alcohólico a 15 ó 16 grados. Se pasan a botas de 30 -

arrobas de capacidad, construídas con madera de roble, en la que se deja aproximadamente la sexta parte en vacío. En estas condiciones, si la temperatura no es demasiado alta, ni baja en exceso, con preferencia las comprendidas entre 15 y 18 grados, no tarda en aparecer el típico "velo", primero en islotes que van aumentando de tamaño hasta llegar a unirse unos con otros y cubrir totalmente la superficie del vino.

Entra, así, el vino en crianza. Consiste esta en disponer una serie de botas colocadas unas encima - de otras formando largas hileras, de hasta tres y cuatro pisos. Generalmente, cada piso contiene un mismo tipo de vino y en idéntico grado de crianza. A estos distintos pisos se les suele denominar "escalas". La escala con vino más viejo constituye la Solera, ocupando ésta siempre la fila más baja, la más cercana al suelo, y sucediéndose por encima de ellas las filas de botas que constituyen las distintas "criaderas", llegándose al vino del año, al que se suele llamar "mosto".

Normalmente existen dos o tres criaderas.

En el fondo de cada bota van siendo señalados con tiza el tipo de vino que va originándose, así como el origen del mosto y datos particulares de cada bodega.

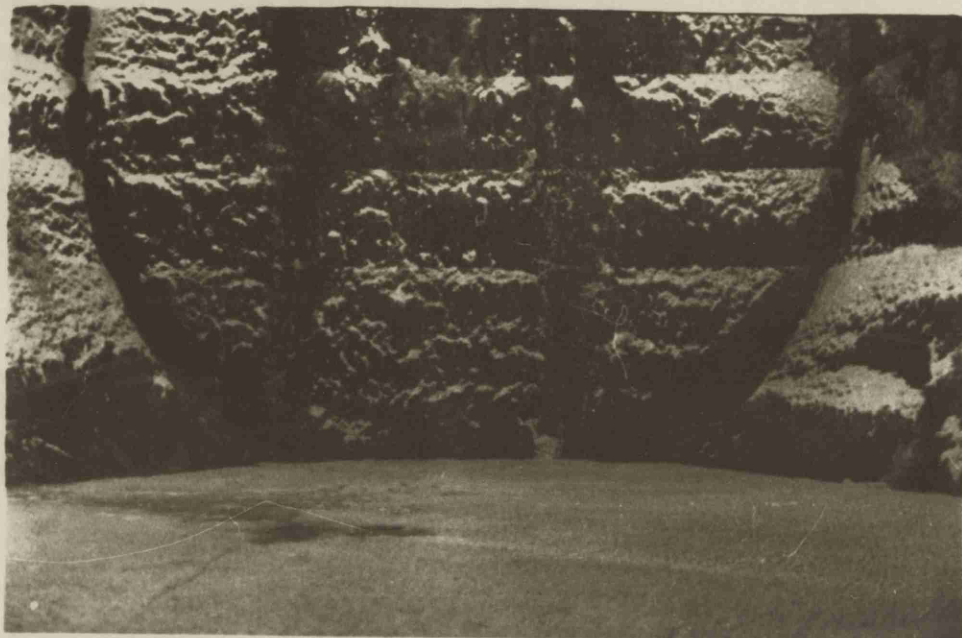
Cuando el catador lo crea oportuno se realizan



Tinajas de fermentación



Bodega de crianza



Aspecto interior de una bota



Aspecto macroscópico del velo

algunos tratamientos, como la clarificación, si acaso - un nuevo deslije hasta llegar el momento oportuno del - pase de una criadera a otra. Estos trasiegos nunca son totales y casi siempre van determinados por las "sacas" de vino de la solera, que es repuesta hasta su volumen normal con vino de la primera criadera y esta con el de la segunda y así sucesivamente. Se realizan los trasiegos con jarras y embudos; los embudos llevan en su extremo un tubo con abundantes orificios pequeños, los llamados "rociadores", que tienen por objeto que el nuevo vino caiga sin destruir el velo y sin producir grandes agitaciones y recibiendo el vino a la vez una muy beneficiosa aireación, necesaria para el normal desarrollo de las levaduras que constituyen la "flor".

Se obtiene así el típico vino de esta región, - el "fino-amontillado", pálido, de perfume penetrante, - con 15 a 17 grados de riqueza alcohólica y que a la boca son ligeros, levemente amorgosos y con una delicadez especial e inconfundible.

Muy típicos también de esta región, y de extraordinaria calidad, tanto como para originar elaboraciones semejantes en Jerez, son los "amontillados". Estos se obtienen a partir de vinos que ya llevan hasta seis años de crianza, entonces son encabezados con diferentes rociados de alcohol hasta una graduación bastante alta, alrededor de los 18 grados con lo que la vida de

las levaduras que constituyen el velo se hace imposible y este desaparece y siguiéndose entonces un añejamiento debido únicamente a causas químicas y físico-químicas.

Otro tipo, aunque menos frecuente, son los "ole rosos". Estos vinos se obtienen encabezando el vino - del año en el momento del deslio o descube hasta 18 ó - 19 grados con lo que el vale no llega a desarrollar y son pues sometidos a un envejecimiento puramente químico y físico-químico sin intervención alguna de envejecimiento biológico.

PRODUCCION Y SU VALOR

Insertamos a continuación los datos referentes a la producción de uva y vino de la provincia de Córdoba en el año 1957 en que tuvo lugar el comienzo de nuestro trabajo. Hay que hacer resaltar que, aunque los datos se refieren a la totalidad de la provincia de Córdoba —con otras zonas productoras— es indudable que el foco principalísimo de producción es la zona de Montilla-Moriles, objeto de nuestro estudio (39).

Superficie en producción: 10.490 Has.

Rendimiento en Qms. de uva por Ha.: 33,4

Producción de uva: Total: 350.564 Qms.

Consumo: 20.300 Qms.

Para vino: 330.264 Qms.

Rendimiento en litros de vino por Qm. de uva: 60

Producción total de vino: 198.158 Hl.

Valor de la producción en miles de pts.:

Total	77.887
Consumo	4.568
Vino	73.314

PRIMERA PARTE

I.- MICROBIOLOGIA DE LA FERMENTACION

ANTECEDENTES HISTORICOS

Fué el holandés Antonj van Leeuwenhoek quién, en 1680, primero observó células de levaduras en mosto de uva en plena fermentación, utilizando para ello unos rudimentarios microscopios que él mismo construía. Comunicó sus experiencias a la Royal Society de Londres en una serie de cartas escritas en su idioma, acompañadas de diseños de la observado.

En 1828, Desmazieres afirmó lo que Leeuwenhoek - había descubierto, siendo Cagniard-Latour poco después, en 1837, el que demostró que la levadura de vino estaba formada por organismos vivos pertenecientes al reino vegetal y que eran capaces de reproducirse. En el mismo año, el alemán Schwann después de sus experiencias, afirmó que en toda fermentación alcohólica estaban presentes células de levadura.

Es en 1838 cuando Meyen denomina a estos vegetales *Saccharomyces* aludiendo a la propiedad de estos hongos de consumir azúcar, denominación que perduró durante mucho tiempo para aquellos microorganismos unicelulares que se reproducen por gemación (40).

Se suscita durante estos años la célebre polémica entre Liebig y Pasteur, ya que el primero rechazaba - el origen biológico de la fermentación, considerando la célula de levadura como una parte de la sustancia fermen

tadora, que se hallaba en la fase de división, transmitiéndose la energía liberada así a la molécula de azúcar, provocando el desdoblamiento en alcohol y anhídrido carbónico, desdoblamiento que por otra parte era ya admitido merced a los estudios de Gay-Lussac y los posteriores de Dumas y Boullay, que finalmente establecieron lo que actualmente se conoce como ecuación de Gay-Lussac, es decir que la molécula de glucosa, al ser desdoblada, origina dos moléculas de anhídrido carbónico y dos de etanol. El gran sabio francés Louis Pasteur, - con una serie completísima de experiencias demostró totalmente el papel desarrollado por las levaduras en la fermentación alcohólica y en 1876 emitió su teoría de la fermentación en la que mantiene que las células de levadura vivas se ven obligadas en ciertas condiciones a vivir al resguardo del aire, trabajando entonces como agentes fermentativos (30).

Durante el transcurso de estos mismos años, una serie de botánicos se aplican al estudio de estos microorganismos, así en el año 1868 Seynes descubre la esporogenesis en ciertas levaduras, carácter de enorme importancia para su clasificación e identificación; dos años después, Rees observa en numerosas levaduras esporas y hace resaltar esto como característica de gran importancia del género *Saccharomyces*. Da una primera clasificación de las especies de *Saccharomyces* basada en sus diferentes formas celulares, aunque es Hansen quien,

años después demuestra que este carácter no es distintivo, dado que una misma levadura puede presentar, en diferentes condiciones, distintas formas.

A partir de 1880, el danés Emil Chr. Hansen inicia sus estudios sobre la fisiología de la fermentación y de los microorganismos. Empleando el método de diluciones sucesivas logra la obtención de cultivos puros y afirma que algunas de las enfermedades de la cerveza no eran causadas por bacterias, como afirmaba Pasteur, sino que se debían a determinadas especies de *Saccharomyces* y que las especies definidas por Rees correspondían en realidad a varias y no a una sola. Aplica los métodos que Koch emplea en bacteriología, es decir dispersión en medio líquido y fijación posterior con gelatina; así logra la obtención de colonias puras y de sus experiencias con éstas llega a la conclusión de que el proceso fermentativo debe ser llevado exclusivamente con levadura cultivada, criterio que llevó a la práctica en una fábrica de cerveza en Copenhague.

En 1904, Hansen clasifica de modo racional las levaduras; distingue entre esporígenas y no esporígenas, las primeras constituyen la familia de las *Saccharomycetáceas* mientras que las segundas son admitidas en los géneros *Tórula*, *Mycoderma* y *Cryptococcus* (54).

El criterio de Hansen de emplear levadura pura seleccionada es llevado al campo enológico por el botánico

co suizo Muller-Thurgay en 1890. En el curso de sus trabajos, ésta aisló del mosto de uva en fermentación dos tipos de levadura, a las que por su forma llamó apiculadas y elípticas. Realizó entonces fermentaciones en pureza con cada una de estas y con la mezcla de ambas, comprobando la acción desfavorable de la apiculada para la calidad del vino obtenido, ya que ésta fermenta los azúcares del mosto con un metabolismo muy impuro y deduciendo en consecuencia la necesidad de emplear levadura elíptica solamente.

En el siglo actual son sobresalientes los estudios realizados por Guilliermond, en 1928 (32) reformula la clasificación primitiva de Hansen y divide la familia Saccharomycetáceas en cinco géneros. En su obra describe los métodos de diferenciación utilizados y que se basan en los caracteres morfológicos, sexualidad y fermentación de diferentes azúcares.

Posteriormente, en 1931 destaca la obra de Steilling Dekker sobre levaduras esporígenas (58); las de Lodder en 1934 (41) y Didden y Lodder en 1942 (25) sobre las no esporígenas que culminan en la extraordinaria obra de Lodder y Kreger van Rij (42) en la que preconiza una clasificación casi unánimemente aceptada por todos los centros científicos del mundo.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Fué el italiano De Rossi quién, viendo la necesidad de conocer cuáles y cuántas son las levaduras que intervienen en los procesos fermentativos espontáneos de los mostos de uva, comienza en la vendimia de 1933 estas investigaciones de un modo sistemático en la región italiana de Umbria, iniciando así las investigaciones modernas sobre la microbiología de la fermentación vínica (17) Tomó en consideración 87 mostos de esta región de los que fueron obtenidos 397 cultivos puros de levaduras, de mostrándose que las dos especies predominantes eran la *Kloeckers apiculata* y el *Saccharomyces ellipsoideus*. Hizo notar que, aunque raramente, el *Saccharomyces ellipsoideus* podía faltar y que la buena marcha de la fermentación era asegurada por la presencia de otras especies de elevado poder fermentativo. También puso de manifiesto que en algunos mostos se encontraban solo formas apiculadas dotadas de bajo poder fermentativo, con lo que en tales muestras, la fermentación natural no podía asegurar la obtención de vinos con caracteres normales y que en estos casos se hacia necesario el empleo de cultivos adecuados de levaduras. Además, se encontraron otros blastomicetos con poder fermentativo elevado, como el *Saccharomyces bayanus* o mediano como la *Torulaspora rosei* y la *Kloeckers magna*, y poder fermentativo bajo co

mo la *Candida pulcherrima*.

Estas investigaciones son continuadas por Castelli, quién va introduciendo una serie de modificaciones en la técnica seguida por De Rossi, logrando a través de sus trabajos la puesta a punto de una técnica de aislamiento e indentificación de levaduras vínicas perfectísima, que es la que se sigue prácticamente en todos los trabajos que se desarrollan posteriormente, y con la que se identifican una serie de microorganismos en mostos de numerosas regiones vitivinícolas italianas, por este autor y sus colaboradores.

Así, en 1936 es estudiada por Castelli la zona de Chianti, donde se produce el célebre vino de igual denominación. Fueron examinados 525 cultivos puros de levaduras encontrándose también que las especies predominantes eran la *Kleckers apiculata* y el *Saccharomyces ellipsoideus*. También se encontraron la *Torulaspora rosei* y la *Candida pulcherrima* así como otras muchas especies, algunas de las cuales capaces de producir gran cantidad de alcohol, como *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces pastorianus* (18). Esta misma zona fué de nuevo estudiada por Castelli en la vendimia de 1937 obteniendo resultados que en nada se diferenciaban de los obtenidos el año anterior.

En los siguientes años realiza una serie de investigaciones en la Italia central, juntamente con algu-

nos colaboradores. Así en 1939, con Santarelli en la región del Lazio y a partir de 22 mostos son obtenidos 194 cultivos puros; en 1946 sobre 40 mostos del Piceno son aislados 203 cultivos; en 1947 en Orvieto se obtienen 55 cultivos; en 1947 Becci, aísla 125 cultivos de la Marca septentrional; Agripa en 1948 aísla 60 cultivos en los Abrozos; Capriotti, en 1952 en la zona de la Rufina (Toscana) obtiene 328 cultivos, y en 1953 Capriotti y Cantarelli aíslan 100 cultivos puros en la Cerdeña. Todos estos estudios dan resultados muy semejantes y resultados análogos son obtenidos cuando se tomaron en consideración mostos de las zonas septentrionales italianas. Así, Capriotti y Cantarelli, en la vendimia de 1949 estudian mostos de la provincia de Treviso (Veneto) (10) y Capriotti, en 1951, los mostos del Trentino-Alto-Adigio (6). - Pues bien, mientras los resultados obtenidos por Capriotti y Cantarelli en la provincia de Treviso no se diferencian de los obtenidos en la zona central de Italia, - en los Mostos del Trentino-Alto-Adigio se observó una gran frecuencia del *Saccharomyces pastorianus* que, especialmente en las localidades muy frías parece sustituir al *Saccharomyces ellipsoideus*, resultado recientemente confirmado en España por Iñigo y Vazquez (38), en mostos de manzana.

Al mismo tiempo, son llevadas investigaciones sobre mostos de zonas cálidas y muy cálidas de Italia (15). Así en 1945 son estudiados los mostos de Sicilia occiden

tal obteniéndose resultados confirmados posteriormente por Caramazza (1946), Castelli (1948) y Castelli y Del Giudice (24) (1952) al estudiar la misma región.

En la vendimia de 1947, Castelli estudia la región de la Puglia. En la parte septentrional de esta región el aspecto microbiológico de los mostos en fermentación no varía de los observados en las otras localidades italianas, mientras que en la parte meridional, donde el clima es muy cálido, el aspecto varía ya que aparecen levaduras apiculadas, capaces de formar esporas y reportables al género *Hanseniaspora* mientras que las levaduras apiculadas de regiones menos cálidas son no esporígenas y pertenecientes al género *Kloeckera* - (4). Observándose, pues, que a medida que se pasa de localidades de clima templado a zonas más cálidas, aumentan progresivamente las especies esporígenas, siendo éstas las únicas que se encuentran en zonas muy cálidas. Resultado ya confirmado en todos los estudios realizados posteriormente, como los llevados a cabo - por el mismo Castelli en Israel en la vendimia de 1950, y en los efectuados en la región del volcán Etna, donde examinó mostos tomados a distintas alturas sobre el nivel del mar dado que la vid es cultivada a lo largo de toda la falda del volcán (19). Se puso en evidencia - la influencia que el clima ejerce sobre los agentes de vinificación pues mientras que en Israel predominan - las formas esporígenas de forma absoluta, en la región

del volcán Etna, a medida que se sube y se pasa de localidades más cálidas a menos, el número de levaduras esporigenas disminuye, aumentando progresivamente el de las no esporigenas. En 1950, Capriotti, estudia la zona de la Calabria (8).

Del estudio total (14) de este conjunto de investigaciones, verdaderamente notable, Castelli y sus colaboradores llegan a la conclusión de que existen especies como *Saccharomyces ellipsoideus* y *Kloeckera apiculata* - que se encuentran en todos los mostos estudiados. Son - pues los principales agentes de la fermentación vínica.- Un segundo grupo de especies lo forman *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces mangini*, *Torulaspora rosei*, *Candida pulcherrima*, y *Kloeckera magna* que no se encuentran en todos los mostos, pero sí en muchos de ellos, por lo que es - evidente su participación en la fermentación. Finalmente existe un tercer grupo de especies que incluye un numerosísimo grupo de ellas pero que se presentan con muy poca frecuencia, por lo que su presencia debe considerarse como accidental.

Además de estos trabajos, otros autores también en Italia estudian otras regiones aunque empleando la - técnica desarrollada por Castelli en el Instituto de Perugia.

Así, Del Giudice (23), Picci (50), Florenzano - en la región toscana (29).

Verona, en Pisa, desarrolla estudios taxonómicos como los realizados en Cerdeña (60) y fisiológicos como los referentes a requerimientos vitamínicos de especies encontradas en mostos (61), (62), (63).

Efectúa también Verona trabajos en colaboración, en Grecia, juntamente con Picci, Melas-Jonnides y Carni (64), (65) y con Zardetto en Brasil (66).

También en Italia, Malan estudia la región del Piamonte (43). Es de resaltar el hecho de que todas estas investigaciones llegan a resultados totalmente concordantes con los obtenidos por Castelli y sus colaboradores, lo que valoriza aún más la técnica puesta a punto por él en el Instituto de Perugia que bien puede decirse que es la que se sigue prácticamente en todos los trabajos actuales, pudiéndose afirmar que han creado escuela.

En Francia, país de gran producción vitivinícola, los trabajos sobre esta materia son más bien escasos, llegando a afirmar Peynaud (17) en 1952 que "...las levaduras del vino no han sido jamás estudiadas especialmente en su conjunto". De 1956 data el magnífico trabajo por él dirigido y realizado por Domercq, S.(26) sobre las levaduras de vinos de la Gironde donde identifica 28 especies diferentes reportables a 11 géneros, de los cuales 5 son de levaduras no esporígenas y 6 lo son de levaduras esporígenas, utilizando para ello las técnicas de Castelli. Es el género *Saccharomyces* el que -

cuenta con mayor número de cepas aisladas, todas ellas - pertenecientes a 13 especies. Dos especies son las que llegan a representar el 80% de las cepas aisladas: *Kloeckera apiculata* y *Saccharomyces ellipsoideus*. Ya las restantes especies tienen menos representación, aún destacando el *Saccharomyces chevalieri* y la *Torulaspora rosei* y aislando algunas especies que no habían sido descritas - en mostos y vinos como *Saccharomyces fructuum*, *Pichia fermentans*, *Torulopsis fumata* y *Brettanomyces vini*. Esto en cuanto se refiere a vinos tintos. En vinos blancos hace destacar el hecho de que la "podredumbre noble" causada por la *Botrytis cinerea* influya en la microflora blastomicética de los frutos por ella atacados, así como el hecho de que el *Saccharomyces oviformis* aparezca con una frecuencia muchísimo mayor en vinos blancos que en los tintos, mientras que otras especies tales como *Saccharomyces acidifaciens*, *Saccharomyces heterogenicus*, *Saccharomyces elegans* y *Saccharomyces ludwigi* solo aparezcan en los blancos y nunca en los tintos. También observa que - de la misma especie aislada en la región de vinos blancos presenta un poder fermentativo mayor que la aislada en la región de los vinos tintos.

En cuanto a la marcha de la fermentación, sus observaciones coinciden con los trabajos anteriores en el sentido de que es comenzada por levaduras no esporígenas para ser sustituidas por las esporígenas gradualmente -

hasta concluir con levaduras de alto poder fermentativo, como *Saccharomyces oviformis*, sobre todo en el caso de mostos muy azucarados.

Sus conclusiones son bastante concordantes con los resultados obtenidos por Castelli y sus colaboradores, reafirmando la influencia del clima sobre la microflora de la fermentación.

Con anterioridad se habían realizado en Francia estudios sobre estos temas, y según refiere Domercq (49), Descoffre en 1904 realizó un trabajo bastante completo sobre levaduras de Charentes y viendo la acción que sobre ellas ejercían agentes externos tales como agitación, luz. En 1941, Renaud realiza un estudio sobre las levaduras del Valle del Loire y posteriormente, Martinand estudio el número y repartición de levaduras elípticas y apiculadas al comienzo y fin de la vendimia.

En España los trabajos realizados de un modo sistemático son escasísimos y bien puede afirmarse que han sido comenzados con los estudios llevados a cabo por Castelli e Iñigo en la vendimia de 1955 en la región manchega y zonas limítrofes (20). Los autores llegan a las siguientes conclusiones: las especies de levaduras dominantes en esta región son *Saccharomyces ellipsoideus*, con una frecuencia del 100 por 100, y *Kloeckera apiculata* con una frecuencia del 86 por 100. Les sigue el *Saccharomyces mangini*, de alto poder fermentativo y con una frecuencia del 59 por ciento. A continuación la *Torulas*

pora rosei y el *Saccharomyces oviformis* con semejantes - frecuencias. Con frecuencia mucho menor, alrededor del 20 por ciento aparecen una serie de especies tales como *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces veronae*, *Kloeckera magna*, *Saccharomyces elegans*, *Saccharomyces fructum*, *Saccharomyces chevalieri* y *Saccharomyces exigua*. Con frecuencias aún menores, 10 por ciento aproximadamente, aparecen *Saccharomyces pastorianus*, *Candida pulcherrima* y *Saccharomyces willianus*, en solo dos mostos aparece la *Torulaspora fermentati* y debe considerarse puramente accidental la presencia de *Candida micoderma* y *Saccharomyces rouxii*. Como puede apreciarse todos los cultivos aislados pertenecen a 18 especies distintas de levaduras, de las cuales, 14 son esporigenas y 4 no esporigenas. Resaltan los autores el hecho que los datos encontrados en esta región son casi perfectamente idénticos a los obtenidos por Capriotti en Cerdeña (9) observándose que los vinos de esta isla presentan características más próximas a los vinos españoles que a los italianos.

En la vendimia de 1956, Castelli e Iñigo estudian los agentes de fermentación vínica de La Rioja (21) donde se producen los típicos vinos tintos de igual denominación. Estudian los autores 24 mostos llegando a aislar 352 cultivos puros de levaduras pertenecientes todos a 11 especies reportables a 4 géneros. El *Saccharomyces ellipsoideus* es hallado en todos los mostos examinados y

en algunos se encuentra en prodominio absoluto. Las levaduras de forma apiculada de los mostos de la Rioja deben referirse exclusivamente a *Kloeckera apiculata*, hallándose en 22 de los 24 mostos examinados. También tiene una activa participación en la fermentación la *Torulaspora rosei* que aparece con una frecuencia del 58%. Por vez primera aparece la *Candida pulcherrima* en tan elevada frecuencia, ya que lo hace en el 50 por ciento de los mostos examinados. Se confirma también la presencia de *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces mangini* y *Saccharomyces chevalieri* en la fermentación vinica. Aparece con discreta frecuencia el *Saccharomyces pastorianus* que solo había sido aislado en Italia en regiones frías. En dos de los mostos considerados pudieron observar que, después de 10 días de fermentación, las levaduras halladas estaban dotadas de bajísimo poder fermentativo, pertenecientes a los géneros *Kloeckera* y *Candida*. Los poderes fermentativos de las especies aquí aisladas e identificadas es totalmente análogo a los hallados en otras regiones estudiadas con anterioridad.

Posteriormente, y en la vendimia de 1958, Iñigo y Vázquez han tomado en consideración la zona de los famosísimos vinos de Jerez, El Condado y El Aljarafe (37).

En la zona de Jerez, las muestras son tomadas en los cuatro pagos más característicos como son Carrascal,

Macharnudo, Sanlúcar y Balbaina. El total de cepas aisladas por los autores puede ser referido a 13 especies, siete de las cuales dotadas de elevado poder fermentativo: - *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces mangini*, *Saccharomyces italicus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces oviformis* y *Saccharomycodes ludwigii*; dos de poder fermentativo medio: *Torulaspora rosei* y *Saccharomyces veronae*; y las cuatro restantes son de escasa capacidad fermentativa: *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida pulcherrima* y *Candida utilis*. Puede apreciarse una proporción relativamente elevada, de especies no esporígenas, como consecuencia de la mayor humedad del clima. Esta proporción alcanza un 22,5% en las cepas no esporígenas y han sido aisladas en las tres fases fermentativas, si bien en la primera en proporción cinco veces mayor que en la tercera.

No obstante, son las especies esporígenas las responsables de la fermentación, incluso la inicial, de los mostos de esta zona considerada en conjunto, pues aquellas tienen predominio solo en los pagos próximos al mar como son Balbaina y Sanlúcar.

Saccharomyces ellipsoideus, *Saccharomyces italicus* y *Saccharomyces mangini* son realmente las únicas especies de elevado poder fermentativo que son responsables del acabado de la fermentación pues las cuatro restantes encontradas lo son en muy pequeña proporción.

En conjunto, destacan la aparición de *Candida utilis*, *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomycodes ludwigii* - por vez primera en mostos españoles; la frecuencia elevada de *Saccharomyces italicus*; la escasa frecuencia de *Saccharomyces oviformis* y *Saccharomyces veronae*; el hecho de que en los pagos en que la *Hanseniaspora guilliermondii* interviene activamente en la fase fermentativa inicial, la *Torulaspora* no se encuentra o está en escasa proporción y, por el contrario, donde aquella no ha sido aislada domina ésta en la segunda fase fermentativa y finalmente la ausencia total de *Saccharomyces pastorianus*.

En cuanto a la zona de El Condado y El Aljarafe, todas las cepas aisladas también son referibles a 13 especies, de las que siete lo son de elevado poder fermentativo: *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces manginii*, - *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces italicus*, *Candida krusei* y *Saccharomyces fructuum*; dos, de poder fermentativo medio: *Torulaspora rosei* y *Saccharomyces veronae*; y cuatro de poder fermentativo bajo: *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata*, *Hansenula subpelliculosa* y *Candida guilliermondii*.

El porcentaje de especies no esporigenas es menor que en Jerez, 12% en las dos primeras fases fermentativas y disminuye a la mitad de este valor en la tercera fase.- Su influencia, por tanto, es prácticamente nula ya que inicialmente las especies esporigenas constituyen el 85% y aumentan hasta casi constituir el 95% en la fase final.

La actuación de las especies de elevado poder fermentativo se centra en *Saccharomyces ellipsoideus* y *Saccharomyces mangini* que constituyen el 18% de las cepas aisladas en la fase inicial, el 45% en la fase media para terminar siendo el 75% del total. El resto de cepas dotadas de esta alta capacidad fermentativa tiene poca influencia dado que son encontradas en muy escasa frecuencia.

Es de destacar que dos de estas especies, *Saccharomyces fructuum* y *Candida krusei* fueron aisladas en esta zona por vez primera en mostos de uva españoles.

Torulaspora rosei y *Saccharomyces veronae*, son las especies de poder fermentativo medio que se caracterizan en esta zona, al igual que en Jerez y se encuentran en una proporción, 25%, prácticamente igual.

Por último, otras dos especies son aisladas por primera vez en mostos españoles: *Hansenula subpelliculosa* y *Candida guilliermondii*, ambas de escaso poder fermentativo y que solo fueron aisladas en una de las muestras analizadas. También, y al igual que en todas las zonas relativamente cálidas, no es aislado el *Saccharomyces pastorianus*.

En trabajos desarrollados a partir de 1955, Feduchy y Sandoval (27) han aislado y caracterizado las levaduras que originan la fermentación de los mostos en diversos pueblos de la provincia de Valladolid. Los autores exponen en su publicación que en La Nava del Rey, el número de cepas clasificadas como similares al *Saccharomyces*

cerevisiae, son muy abundantes, presentando fácil esporulación. Le siguen en menor proporción el *Saccharomyces* (*Torulaspora*) *fermentati*, *Saccharomyces* (*Torulaspora*) *reesei*, *Candida pulcherrima* y *Saccharomyces elegans*, dominando al final de la fermentación *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fermentati* y *Saccharomyces carlsbergensis*. En Rueda aparecen las asimiladas a *Saccharomyces cerevisiae* en proporción parecida a las de La Nava del Rey, siguiendo con marcada disminución en número *Saccharomyces pastori*, *Saccharomyces steineri*, *Candida pulcherrima* y *Pichia membranaefaciens*. Al final de la fermentación se hace más marcado que en La Nava el dominio de *Saccharomyces cerevisiae*. En la flora de La Seca se destaca más el número de cepas clasificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, disminuyendo el número de las *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces florentinus* y *Saccharomyces steineri*. En Peña-fiel, siguen apareciendo especies asimilables a *Saccharomyces cerevisiae* y en menor proporción *Saccharomyces reesei*, *Saccharomyces carlsbergensis* y *Saccharomyces fermentati*, así como *Saccharomyces italicus* y *Saccharomyces oviformis*.

En la vendimia de 1959, la zona de Extremadura ha sido estudiada por Iñigo, Arroyo y Ripio (35).

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LAS LEVADURAS

Son muchos los factores que pueden ser causa de variaciones en la composición de la flora epifítica de la uva: la naturaleza del terreno, los sistemas de cultivo y abonado, las características climatológicas y en general el momento de la recogida del fruto condicionada a su vez por el estado de madurez.

La composición química del mosto determina principalmente cuáles de las levaduras existentes en la uva podrán subsistir e intervenir en su fermentación. Las especies que la inician de escaso poder fermentativo, se imponen al principio por su gran superioridad numérica en cuanto a células presentes. No tienen mucha actividad ni resistencia al alcohol y no pueden sobrevivir cuando la graduación alcohólica se eleva en tanto que las más resistentes, capaces de terminar la fermentación de los mostos cuando ya es baja la concentración del azúcar, no obstante su mayor actividad tardan bastante en adquirir predominio y a menudo no pueden ser caracterizadas en los comienzos del proceso fermentativo. Las especies de levaduras presentes en el mosto van cambiando, se van sucediendo durante la fermentación y para obtener una representación de todas ellas se hace necesario aislarlas y caracterizarlas en las distintas etapas del proceso.

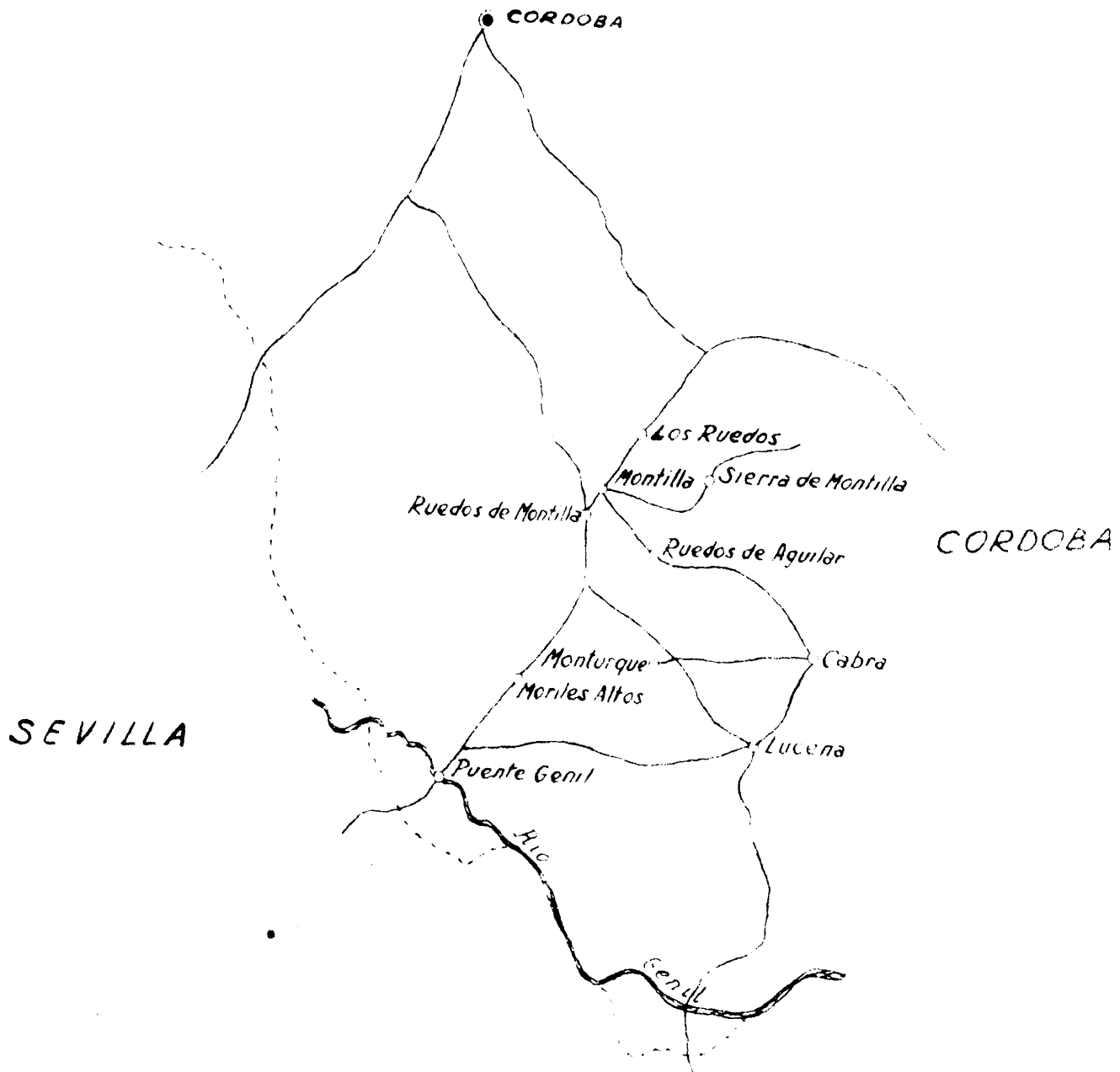
TECNICA DE LA TOMA DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO

Para eliminar en lo posible la multiplicidad de causas que pueden interferir en la obtención de resultados representativos de la zona, se recogieron muestras de todas las localidades productoras de uva y que relacionamos a continuación: Monturque, Ruedos y Sierra de Montilla, Llanos de Moriles y Moriles Altos, Puente Genil y Aguilar siguiendo una línea que va de nordeste a suroeste, hasta el río Genil. Por ser en las zonas denominadas "ruedos" donde se producen las mayores cantidades de uva, de ellas procede la mayor proporción de muestras, seis en total.

Sobre cada muestra obtenida se hicieron aislamientos de las levaduras según la técnica de la escuela de Perugia, en tres momentos sucesivos: inmediatamente después de la recogida y antes de iniciarse la fermentación; a los tres o cuatro días cuando está en plenitud la fermentación tumultuosa y a los ocho o diez días cuando, pasada ésta, quedan fermentados los restos de azúcares.

Las tomas se hicieron en los lagares de producción recogiendo directamente los mantos que fluían de las pisadoras sin haber sido sulfitadas o enyesadas ni haber recibido tratamiento alguno. Envasados en matraces estériles preservados de toda contaminación, fueron

MAPA DE LA ZONA



transportados al laboratorio instalado provisionalmente en Montilla, donde se efectuó el primer aislamiento en - el mismo día de la recogida. Sobre estas mismas mues - tras mantenidas a 25 grados y preservadas en las mismas condiciones, fueron hechos los otros dos análisis micro - bianos pero ya en nuestro laboratorio de Madrid.

En total fueron examinados 16 mostos de los que hemos aislado y clasificado detenidamente 240 cultivos - puros de levaduras.

El análisis microbiológico se inició para cada - mosto y fase con el examen microscópico de la muestra, - hecho sobre preparados coloreados con el líquido de Ziehl.

Inmediatamente después, se hicieron los cultivos de aislamiento. La técnica es, brevemente, como sigue: Con un asa estéril de platino se toman tres gotas de mues - tra que se pasan a un tubo de ensayo conteniendo mosto - estéril. Después de homogeneizar, se toman tres nuevas gotas de este tubo y se llevan a otro con mosto también estéril, repitiéndose la operación con un tercero en idé - nticas condiciones. De esta forma se consigue la disemi - nación de las levaduras presentes en la muestra inicial. Al contenido de cada tubo de ensayo se le agrega un volu - men igual de gelatina fundida al 20% en agua y se vierte la mezcla en una caja petri. Solidificada por enfriamien - to la gelatina-mosto, las placas se mantienen unos días a 16-18°. Donde inicialmente hay una sola célula de la - vadura, se desarrolla una colonia que, aprisionada en la

gelatina, no puede confundirse con las colonias próximas, estando formadas por consiguiente, por una especie pura.

Teniendo nuestro estudio un fin esencialmente - aplicativo, procuramos aislar aquellas colonias que se - presentaban en neto predominio pues solo a ellas se deberá la fermentación de los mostos. Con tal fin se hizo - necesaria la obtención de preparados por impresión de - los cultivos en la gelatina-mosto, hecho siempre sobre - la primera placa de las tres correspondientes a cada una de las fases en que hemos dividido la fermentación espontánea.

Con los datos suministrados por la observación - microscópica directa, los preparados por impresión y la observación macroscópica de las colonias se pudo establecer un criterio en la elección de las colonias dominantes. De esta manera, en cada fase del proceso fermentativo, se aislaron cinco cultivos por lo que de cada mosto examinado se obtuvieron quince cultivos puros.

Al cabo de 10-15 días de terminada la fermentación de los mostos en todos y en cada una de las 16 maestras aparecieron unos velos microbianos, rugosos, blancos, cremosos, bien formados y espesos que observados al microscopio resultaron estar formados por levaduras.

Dado que estas levaduras no intervienen en la - fermentación espontánea, aunque están dotadas de alto poder fermentativo, no pueden ser consideradas como agen-

tes de fermentación sino mas bien como agentes aerobios - de oxidación directa o a través de complicadas reacciones intermedias, esto es, como levaduras de "flor", que comunicaron al medio un exquisito y característico aroma. El aislamiento y clasificación de estas levaduras constituye la Segunda Parte de este trabajo.

TECNICA DE LA IDENTIFICACION DE ESPECIES

En la identificación de los cultivos puros se siguió una técnica que con algunas modificaciones, es la indicada por la Escuela holandesa de Kluyver en Delft, señalada en las monografías de Stelling-Dekker (58), Lodder - (41) y Diddens y Lodder (25). La sistemática se hizo de acuerdo con Lodder y Kreger van Rij (42).

Examen microscópico

La identificación de las levaduras aisladas se inició con el examen microscópico de los cultivos sobre agarmalta lo que proporciona datos relativos a la forma y tamaño de las células. La observación se realizó sobre cultivos jóvenes de 48 horas.

También se estudió la forma, tamaño y agrupamientos celulares a las 48 horas de desarrollo en mosto de uva estéril.

Examen de las ramificaciones pseudomiceliales

Se hizo de acuerdo con la técnica de Rivalier-Seydel, que consiste en cultivar la levadura en un estrato - delgado de agar malta colocado sobre un porta-objetos que se apoya en una varilla angular de vidrio, manteniéndose el cultivo durante siete días a 26 grados en ambiente húmedo y preservado de contaminaciones.

Caracteres de los cultivos sobre agar-malta y mosto de uva

Mediante la observación macroscópica de los cultivos en agar-malta a los 60 días de la siembra, anotando - el aspecto de la pátina, color e intensidad del desarrollo, producción de pigmentos y cambios físicos en el medio de cultivo. El desarrollo en mosto se observó a los 30 días de la siembra tomando nota de la existencia de la fermentación, formación de depósito, turbidez o transparencia del mosto y aparición del anillo o velo superficial.

Punción en gelatina-mosto

Los cultivos, hechos por punción en gelatina-mosto, se mantuvieron durante 45 días a 18 grados C. observando durante este plazo el desarrollo y la eventual fluidificación de la masa.

Esporificación

La presencia de esporas se estudió en los culti-

vos viejos de agaremalta y sobre agar-gorodkowa. Para - aquellas cepas que dieron resultados negativos se hicieron pruebas, según las indicaciones de Hansen, llevando el depósito de un cultivo de 48 horas en mosto de uva sobre bloques de yeso colocados en placas petri y en ambiente húmedo. A los 4 días se inició la observación microscópica que se continuó con intervalos de cinco días durante un mes.

Fermentación de azúcares

Se llevó a cabo sobre un medio de cultivo hecho con caldo común de carne, adicionado de 2% del azúcar en examen colocado en un tubo provisto del dispositivo Durham. Se ~~mantuvo~~ mantuvo en observación durante 15 días por si - hubiera fermentaciones tardías. La fermentación de la - rafinosa se hizo en tubos graduados Einhorn.

Asimilación de nitratos

Según la técnica de Stelling-Dakker (58) cultivan do la levadura en terrenos sintéticos adicionados de nitrato potásico y convenientemente agarizados, confrontándose la pátina formada con un testigo desprovisto de nitrato.

Desarrollo en presencia de etanol

Se siguió la técnica de Stelling-Dekker (58) sem-

brando la levadura en un medio sintético de cultivo ad
cionado de un 3% de alcohol etílico como única fuente -
de carbono manteniéndose en observación durante 30 días
para apreciar la eventual existencia de desarrollo.

Escisión de arbutina

Sobre un medio preparado con extracto de levadu
ra agarizado al 2% al que se añadió un 0,5% de arbutina
y unas gotas de solución de cloruro férrico. El resul-
tado positivo se manifiesta por el cambio de color del
agar que pasa a tomar una tonalidad violácea.

Asimilación de azúcares

Fué realizada de acuerdo con la técnica de Ca-
priotti (7) sobre un medio con agar lavado al que se -
agrega un 1% del azúcar que se estudia.

Poder fermentativo y producción de acidez volátil

El poder fermentativo se determinó sobre 50 ml.
de mosto estéril, sin privar de las sustancias coagula-
das y precipitadas por el calor e incrementada su concen-
tración en azúcar hasta un 30%, contenido en matraces -
de 100 ml provistos de una válvula Muller con ácido -
sulfúrico concentrado. Sembrados con la levadura se -
mantuvieron en termostatos a 18 grados. El curso de la

fermentación pudo seguirse por pérdida de peso debido - al anhídrido carbónico desprendido, hasta pesada constante. En función de dicha pérdida de anhídrido carbónico se obtiene la graduación alcohólica alcanzada.

Una vez fermentado el mosto se analizó la acidez volátil producida siguiendo el método indicado en la página 107. Los resultados son expresados en gramos de ácido acético por litro de vino.

Todos los resultados que se obtuvieron fueron anotados en las correspondientes fichas de análisis microbiológico y una vez que se dispuso de todos, se realizó el diagnóstico consiguiente siguiendo la sistemática de Lodder y Kreger van Rij (42).

De estas mismas fichas de análisis microbiológico referidas, han sido extraídos todos los datos que a continuación se exponen en el Primer Cuadro General.

CUADRO GENERAL

Análisis de la muestra fermentada.	Acidez volátil... 0,76 Acidez total..... 4,57 Alcohol..... 14,02	
Curso de la fermentación	Se inicia con asociación de especies de alto y medio poder fermentativo. Termina con S. ellipsoideus asociado con S. mangini	
DIAGNOSTICO	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div> <p>Saccharomyces veronae " mangini " mangini " ellipsoideus " veronae</p> </div> <div> <p>Saccharomyces ellipsoideus " ellipsoideus " mangini Torulaspora rosei Saccharomyces mangini</p> </div> <div> <p>Saccharomyces mangini " mangini " ellipsoideus " mangini " ellipsoideus</p> </div> </div>	
Acidez volátil (g/l)	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div>0,53 1,06 1,18 1,18 0,53</div> <div>1,23 1,00 0,94 0,29 1,53</div> <div>1,12 1,65 0,82 1,35 1,00</div> </div>	
Poder fermentativo (°)	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div>7,5 13,2 13,5 15,5 6,5</div> <div>15,0 14,2 15,0 11,5 14,7</div> <div>13,2 13,7 15,0 13,7 15,0</div> </div>	
C e p a s	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div>1 2 3 4 5</div> <div>6 7 8 9 10</div> <div>11 12 13 14 15</div> </div>	
Fase Ferment.	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div>I</div> <div>II</div> <div>III</div> </div>	
Sustrato	Uva "Pedro Ximenez"	
Localidad	Arenales de Puente Genil (Aguilar), 16 km al Sudeste de Montilla.	
Nº de muestra	1	

2	Ruedos de Montilla, 3 km al sur de Montilla	Uva "Pedro Ximenez"	I	16 17 18 19 20	14,0 14,2 13,6 15,7 14,5	1,12 1,00 0,9 1,23 1,0	Saccharomyces mangini " ellipsoideus " ellipsoideus " ellipsoideus " mangini	El curso de la fermentación es análogo al mosto anterior.	Ac, volátil ... 0,6 g/l A. total..... 4,43 " Alcohol..... 14,52
			II	21 22 23 24 25	9,2 13,2 15,0 15,0 16,2	0,23 1,12 1,12 0,82 1,12	Torulaspora rosei Saccharomyces mangini " mangini " ellipsoideus " ellipsoideus		
			III	26 27 28 29 30	16,2 14,5 16,2 14,5 16,0	1,12 1,29 1,0 1,06 1,12	Saccharomyces mangini " mangini " mangini " ellipsoideus " ellipsoideus		
3	Moriles Altos, 16 km al sur de Montilla.	Uva "Pedro Ximenez"	I	31 32 33 34 35	8,0 9,2 8,5 8,0 7,5	0,35 0,29 0,41 0,41 0,35	Saccharomyces veronae " veronae " veronae " veronae " veronae	Empieza con dominio total de S. veronae para concluir con predominio casi completo de S. ellipsoideus.	Ac. volátil...1,09 g/l Ac. total.... 5,52 " Alcohol.....15,72
			II	36 37 38 39 40	6,7 9,5 8,0 9,2 7,5	0,29 0,29 0,41 0,35 0,35	Saccharomyces veronae " veronae " veronae " veronae " veronae		
			III	41 42 43 44 45	15,5 14,5 15,5 8,0 13,7	1,18 1,18 0,76 0,35 0,65	Saccharomyces ellipsoideus " ellipsoideus " ellipsoideus " veronae " ellipsoideus		

4	Moriles Altos, 16 km al sur de Montilla	Uva "Pedro Ximenez"	I II III	46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60	6,7 8,5 7,0 8,2 8,0 9,2 9,2 8,7 8,7 4,2 15,5 14,5 8,5 15,7 9,7	0,35 0,35 0,41 0,41 0,35 0,29 0,35 0,29 0,29 1,18 1,12 1,53 0,53 1,23 0,29	Saccharomyces veronae " veronae " veronae " veronae " veronae Saccharomyces veronae Torulaspora rosei Saccharomyces veronae Saccharomyces veronae Saccharomyces veronae Saccharomyces ellipsoideus " mangini " veronae " mangini Torulaspora rosei	Inicia con dominio total de <i>S. veronae</i> , para concluir - con asociación de diversas especies.	Ac. volátil.... 1,09 g/l Ac. total..... 5,80 " Alcohol..... 15,28
5	Los Ruedos de Montilla, 5 km al nordeste de Montilla	Uva "Pedro Ximenez"	I II III	61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75	15,0 15,0 6,0 6,7 16,5 15,5 16,0 16,0 16,2 15,2 13,7 14,0 14,5 16,0 15,7	1,23 1,35 0,59 0,47 0,76 1,29 1,29 1,06 1,29 1,2 1,35 1,35 1,0 1,12 1,0	Saccharomyces mangini " mangini Torulaspora rosei Saccharomyces veronae " ellipsoideus Saccharomyces mangini " oviformis " ellipsoideus " ellipsoideus " ellipsoideus Saccharomyces ellipsoideus " mangini " ellipsoideus " ellipsoideus " ellipsoideus	Dominio de <i>S. mangini</i> al comienzo y de <i>S. ellipsoideus</i> al terminar.	Ac. volátil.... 0,33 g/l Ac. total..... 4,43 " Alcohol..... 10,98

	Ac. volátil... 0,38 g/l Ac. total..... 4,09 " Alcohol..... 13,32	Ac. volátil... 0,44 g/l Ac. total..... 3,75 " Alcohol..... 13,52
	Inician S. ellipsoideus y S. mangini para concluir prácticamente igual	Ligero dominio inicial de Z. - florentinus, de escaso poder fermentativo. Termina con levaduras de alto poder fermentativo en asociación.
	<div>Saccharomyces ellipsoideus " mangini " ellipsoideus " mangini Torulopsis bacillaris Saccharomyces mangini " ellipsoideus " ellipsoideus " ellipsoideus " mangini Saccharomyces ellipsoideus " mangini " mangini " ellipsoideus " ellipsoideus</div>	<div>Saccharomyces ellipsoideus " mangini Zigosaccharom. florentinus Saccharomyces veronae Zigosacch. florentinus Saccharomyces mangini " ellipsoideus " ellipsoideus " ellipsoideus " mangini Saccharomyces mangini " oviformis " ellipsoideus " ellipsoideus " italicus</div>
	<div>1,23 1,35 1,41 1,41 0,88 1,59 1,35 1,18 1,06 1,53 1,23 1,23 1,23 1,12 1,23</div>	<div>0,88 1,29 0,35 0,41 0,41 1,23 1,53 1,06 1,23 1,12 1,35 1,41 1,18 1,23 0,82</div>
	<div>15,0 15,0 15,5 15,0 8,0 15,0 15,0 16,2 15,5 15,5 13,2 16,2 15,5 15,0 15,7</div>	<div>16,2 16,2 8,0 6,7 7,5 15,5 16,5 16,5 15,7 15,7 13,7 15,5 15,0 15,55 16,0</div>
	<div>76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90</div>	<div>91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105</div>
	<div>I II III</div>	<div>I II III</div>
	Uva "Pedro Ximenez"	Uva "Pedro Ximenez"
	Ruedos de Aguilar, 6 km al este de Montilla	Ruedos de Aguilar, 6 Km al este de Montilla.
6		7

8	Sierra de Montilla, 9 km al este de Montilla.	Uva "Pedro Ximenex"	I	106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120	6,7 10,7 7,0 6,5 7,0 5,0 4,5 4,2 15,0 15,0 14,7 15,7 15,5 14,2 15,0	0,53 0,41 0,59 0,41 0,41 1,41 1,29 1,23 0,88 1,23 1,47 0,88 1,35 1,35 0,94	Saccharomyces veronae Torulaspora rosei Saccharomyces veronae Saccharomyces veronae Saccharomyces veronae Kloeckera " " " " Saccharomyces " " ellipsoideus ellipsoideus " " ellipsoideus mangini ellipsoideus " " " " " " " "	Comienza con dominio de S. veronae y concluye con S. mangini asociado con S. ellipsoideus.	Ac. volátil... 0,16 g/l Ac. total..... 5,38 " Alcohol..... 13,32
9	Sierra de Montilla, 9 km al este de montilla.	Uva "Pedro Ximenez"	I	121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135	6,5 7,5 8,0 8,7 9,5 14,7 4,7 14,2 14,5 14,2 15,0 15,0 15,0 17,0 14,2	0,47 0,41 0,41 1,0 0,35 1,12 1,29 1,29 1,06 1,78 1,06 1,06 1,12 1,06 1,06	Saccharomyces veronae " " " " Torulopsis bacillaris Saccharomyces veronae Saccharomyces mangini Kloeckera apiculata Saccharomyces ellipsoideus " " ellipsoideus " " ellipsoideus chevalieri " " " " " " " "	Dominio inicial de S. veronae apareciendo T. bacillaris. - Termina con S. ellipsoideus, S. mangini y S. chevalieri, - todas de elevado poder fermentativo.	Ac. volátil... 0,24 g/l Ac. total..... 5,42 " Alcohol..... 14,22

10	Monturque, 15 km al suroeste de Montilla.	Uva "Pedro Ximenez"	I	136 137 138 139 140	9,2 8,7 9,2 15,3 10,7	0,35 0,29 0,29 1,0 1,06	Saccharomyces veronae " veronae " veronae Torulopsis ellipsoideus bacillaris	Ac. volátil... 0,53 g/l Ac. total..... 0,71 " Alcohol..... 14,32
			II	141 142 143 144 145	16,2 15,7 16,0 17,0 16,5	0,88 1,0 0,82 0,82 0,94	Saccharomyces oviformis ellipsoideus oviformis oviformis ellipsoideus	Características muy semejantes al anterior, salvo la presencia de S. oviformis en la fase final.
			III	146 147 148 149 150	15,5 15,0 17,0 15,5 15,5	0,76 0,88 1,0 0,70 0,94	Saccharomyces oviformis ellipsoideus ellipsoideus ellipsoideus mangini	
11	Monturque, 15 km al suroeste de Montilla.	Uva "Pedro Ximenez"	I	151 152 153 154 155	6,5 3,7 3,5 7,5 8,0	0,94 1,23 1,0 1,0 0,88	Hanseniaspora guilliermondii guilliermondii spiculata Hanseniaspora guilliermondii guilliermondii	Ac. volátil... 0,30 g/l Ac. total..... 3,41 " Alcohol..... 14,52
			II	156 157 158 159 160	15,7 16,0 16,2 16,2 15,2	0,82 0,71 1,06 1,0 1,06	Saccharomyces oviformis oviformis ellipsoideus ellipsoideus ellipsoideus	Dominio inicial de H. guilliermondii, de poder fermentativo medio. Termina con asociación de S. ellipsoideus y S. oviformis.
			III	161 162 163 164 165	16,2 16,0 14,5 15,0 15,0	0,88 0,65 1,0 0,88 0,94	Saccharomyces oviformis oviformis ellipsoideus ellipsoideus ellipsoideus	

12		Puente Genil, zona de Moriles.	Uva "Pedro Ximénez"	I	166 167 168 169 170	6,7 8,7 5,0 6,7 2,5	1,0 0,18 1,12 0,94 0,18	Hanseniaspora guilliermondii Torulaspora rosei Kloeckera apiculata Kloeckera apiculata Candida pulcherrima		Ac. volátil... 0,39 g/l Ac. total..... 5,79 " Alcohol..... 13,82
				II	171 172 173 174 175	7,5 15,0 14,3 11,2 16,2	0,35 0,88 0,82 0,18 0,71	Saccharomyces veronae " oviformis " ellipsoideus Torulaspora rosei Saccharomyces oviformis		
				III	176 177 178 179 180	15,5 15,7 14,2 15,5 17,0	0,65 0,94 0,94 0,82 0,82	Saccharomyces mangini " mangini " ellipsoideus " oviformis " oviformis		
13		Puente Genil, zona de Moriles.	Uva "Pedro Ximénez"	I	181 182 183 184 185	10,0 10,0 6,7 9,2 7,5	0,29 0,41 0,41 0,35 0,41	Saccharomyces veronae Torulaspora rosei Saccharomyces veronae " veronae " veronae		Ac. volátil... 0,77 g/l Ac. total..... 5,0 " Alcohol..... 14,22
				II	186 187 188 189 190	15,7 15,5 10,0 10,0 10,0	1,12 0,76 0,35 0,88 0,35	Saccharomyces ellipsoideus " oviformis Torulaspora rosei Saccharomyces veronae Torulaspora rosei		
				III	191 192 193 194 195	15,7 8,0 15,5 15,2 15,0	1,0 0,41 0,88 1,06 0,88	Saccharomyces mangini " veronae " mangini " mangini " mangini		
								Cuatro especies en la primera fase sin predominio de ninguna. Termina S. Mangini, S. oviformis y S. ellipsoideus.-		
								Dominio de S. veronae en la 1ª fase para terminar con S. mangini sin que aparezca el S. ellipsoideus.		

14	Ruedos de Montilla, 2 km al sur de Montilla.	Uva "Pedro Ximénez"	I	196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210	15,0 8,2 15,5 9,2 10,5 15,0 16,2 15,2 16,0 16,0 14,5 15,2 15,2 14,7 19,0	1,35 0,35 1,29 0,35 0,59 0,94 1,0 1,12 0,46 0,91 1,43 1,05 1,18 1,24 0,72	Saccharomyces mangini Zigosacchar. florentinus Saccharomyces mangini Saccharomyces veronae Torulaspora rosei Saccharomyces mangini ellipsoideus mangini mangini ellipsoideus Saccharomyces oviformis mangini ellipsoideus mangini ellipsoideus	Ac. volátil... 1,07 g/l A. total..... 4,08 " Alcohol..... 13,82
15	Ruedos de Montilla, 2 km al sur de Montilla.	Uva "Pedro Ximénez"	I II III	211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225	15,5 15,5 15,0 13,5 17,2 15,0 16,2 15,5 11,7 15,7 15,0 14,7 14,2 15,0 14,7	1,18 0,98 1,05 1,18 0,59 0,85 0,98 0,85 1,05 1,3 1,24 0,85 1,05 0,91 1,3	Saccharomyces ellipsoideus chevalieri ellipsoideus ellipsoideus mangini Saccharomyces mangini mangini oviformis mangini ellipsoideus Saccharomyces ellipsoideus ellipsoideus oviformis mangini mangini	Ac. volátil... 1,01 g/l Ac. total..... 4,60 " Alcohol..... 13,72
Inicialmente levaduras de poder fermentativo medio. Termina con S. ellipsoideus, S. mangini y S. oviformis.		Comienza y termina con las mismas especies, exceptuando S. chevalieri que es sustituido por S. oviformis.						

Ac. volátil...		0,30	g/l
Ac. total.....		3,93	"
Alcohol.....		13,62	"
Dominio en primera fase de S. veronae. Concluye con S. mangini, S. oviformis y S. ellipsoideus.			
I	Saccharomyces veronae	0,33	6,2
	" oviformis	0,85	17,0
	veronae	0,26	10,0
	Kloeckera apiculata	0,98	4,7
	Saccharomyces veronae	0,37	9,5
II	Saccharomyces ellipsoideus	0,92	15,5
	Saccharomyces mangini	0,73	16,2
	Hanseniaspora guilliermondii	1,16	7,0
	Saccharomyces mangini	0,55	17,0
	ellipsoideus	1,53	13,0
III	Saccharomyces ellipsoideus	0,73	15,2
	mangini	0,86	15,0
	mangini	1,04	14,2
	oviformis	0,49	16,0
	oviformis	1,04	14,5
Uva "Pedro Ximénez"			
Ruedos, sierra de Montilla			
16			

LAS ESPECIES AISLADAS Y SU DESCRIPCION

Todas las especies aisladas, causantes de la fermentación espontánea de los mostos considerados, fueron:

Esporígenas:

- 1.- *Saccharomyces ellipsoideus*, Hansen
- 2.- *Saccharomyces mangini*, Guilliermond
- 3.- *Saccharomyces oviformis*, Osterwalder
- 4.- *Saccharomyces chevalieri*, Guilliermond
- 5.- *Saccharomyces italicus*, Castelli
- 6.- *Saccharomyces veronae*, Lodder y K. van Rij
- 7.- *Zigosaccharomyces florentinus*, Castelli
- 8.- *Torulaspora rosei*, Guilliermond
- 9.- *Hanseniaspora guilliermondii*, Pijper

No esporígenas:

- 10.- *Torulopsis bacillaris* (Kroemer et Krumbholz)
Lodder.
- 11.- *Kloeckera apiculata* (Rees) Janke
- 12.- *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch

DESCRIPCION DE LAS ESPECIES AISLADAS

1.- Saccharomyces ellipsoideus Hansen.- El cultivo de 48 horas sobre mosto de uva estéril presente células de tamaño normal, elípticas, algunas globosas, otras ovales, aisladas o reunidas en parejas gemantes o grupos de escasos elementos. Esporifica abundante y fácilmente en agar malta a los pocos días de pasada la colonia desarrollada sobre gelatina mosto. Se forman ascas partenogénéticamente con cuatro esporas y también otras con dos y tres esporas. Las colonias sobre gelatina mosto son - gibosas o en forma de cuernecillos de color blanco sucio, amarillentas con márgenes lisos que no fluidifican la gelatina.

El cultivo en mosto de uva después de 30 días a 18° - 20 grados C. se presenta limpio, transparente, sin trazas de anillo superficial, formándose un buen depósito en el fondo del tubo.

El cultivo en agar-malta es abundante, húmedo - mucoso de color blancuzco. Algunas cepas presentan márgenes ampliamente lobulados y estrías algo punteadas. No se originan cambios físicos en el medio.

La puntura en gelatina-mosto, después de 30 días a 18 grados C, se presenta con desarrollo en clavo, con filamentos muy desarrollados a traves del canal y cabeza alzada, no se produce fluidificación de la gelatina pero

si una fuerte ruptura de la masa.

Caracteres fisiológicos: Negativa la asimilación de nitratos y buen desarrollo en presencia de alcohol etílico como única fuente de alimento hidrocarbonado. Fermenta la glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa y rafinosa 1/3. Asimila los mismos azúcares y no fermenta ni asimila la lactosa.

No escinde la arbutina. Se han determinado los poderes fermentativos y acideces volátiles de todas las cepas aisladas, estando comprendidos los primeros entre 13,25 y 19% de alcohol en volumen. Se ha obtenido en total 76 cepas de esta especie, distribuidas en todos los mostos examinados con una frecuencia por tanto, del 100%.

2.- Saccharomyces mangini Guilliermond.- El cultivo joven en mosto de uva presenta células redondas u ovales, aisladas o en parejas. En agar-malta las células son ovoides y esporificadas, algunas cepas se presentan muy esporuladas con ascas partenogenéticas de dos esporas, otras muchas con cuatro esporas. La colonia en gelatina-mosto es gibosa de color blanco y redonda. El cultivo en mosto de uva, después de 30 días a 18-20 grados, se presenta transparente con anillo y buen depósito, fermentación positiva. La pátina sobre agar-malta es abundante, blanca y opaca. La puntura en gelatina-mosto desarrolla en clavo con cabeza alzada y fuer

te ruptura de la masa.

Caracteres fisiológicos: Negativa la asimilación de los nitratos. Positivo el desarrollo en presencia del alcohol etílico, negativa la escisión de la arbutina. Fermenta la glucosa, galactosa, sacarosa y raffinosa 1/3. No fermenta la maltosa ni la lactosa. Asimila los mismos azúcares que fermenta. Los poderes fermentativos son altos, comprendidos entre 13,25 y 17,25%. Algunas cepas han producido volátiles de hasta 1,25 gramos de acético por litro. Se han obtenido 60 cepas de esta especie, número muy elevado en relación con otras zonas vitivinícolas anteriormente estudiadas (20), (21). Su frecuencia ha sido también alta, habiéndose hallado en 14 de los mostos examinados que representa el 87,5% de frecuencia, poniéndose de manifiesto el interés de esta especie en la terminación del proceso fermentativo de los mostos. Es posible que esta especie se halle relacionada filogenéticamente con otra especie filmógena que aparece en la cuarta fase o fase de "flor" de estos vinos y cuyo aislamiento y clasificación constituye la Segunda Parte de este trabajo.

3.- Saccharomyces oviformis Osterwalder.- El cultivo joven en mosto de uva presenta células ovoides aisladas o en parejas. En agar-malta esporifica bien formándose ascas de dos esporas y también de cuatro. El cultivo de mosto de uva, después de 30 días a 18-20 gra

dos se presenta limpio con depósito muy bien aglomerado y trazas de anillo superficial. La pátina sobre agar — malta es blanca amarillenta, algo punteada, poco luciente y a veces rugosa. La picadura de gelatina-mosto presenta un desarrollo en clavo con buen desarrollo en superficie, ruptura de la masa y sin fluidificación. La colonia en gelatina-mosto, es pequeña, redonda, lisa, — de color amarillo, unas veces gibosa o en forma de ouer necillo.

Caracteres fisiológicos: No asimila los nitratos y desarrolla abundantemente en presencia de alcohol etílico. No escinde la arbutina. Fermenta la glucosa, maltosa, sacarosa y rafinosa 1/3. No fermenta la galactosa ni la lactosa. Asimila los mismos azúcares que — fermenta. Los poderes fermentativos de todas las cepas aisladas han sido altos, comprendidos entre 14,25 y 17%. También la acidez volátil que produce son altas, habiéndose encontrado cepas que daban hasta 1,5 gramos de áci do acético por litro.

También esta especie interviene en la fermentación de los mostos con notable frecuencia, ha sido hallada en nueve mostos y obtenidas 21 cepas. También, — como la anterior, participando activamente en la tercera fase.

4.- Saccharomyces chavalieri Guilliermond.— El — cultivo joven en mosto de uva presenta células de for —

mas ovales, aisladas o reunidas en parejas gemantes o - grupos de tres elementos. El cultivo en agar-malta pre - senta células análogas algo más alargadas y esporifica fácilmente formándose ascas con dos, tres o cuatro espo - ras. En mosto de uva, el cultivo de 30 días a 18-20 - grados, se presenta transparente, con buen depósito y - trazas de anillo superficial. La estria sobre agar-mal - ta es abundante, y mucosa, lisa, de color blanco ama - rillento. La colonia sobre gelatina-mosto es redonda, gibosa, de color amarillento y la incisión en este me - dio es del aspecto de las especies anteriores.

Caracteres fisiológicos: Negativa la asimila - ción de nitratos, ligero desarrollo en presencia de al - cohol etílico, algunas cepas no desarrollaron en absolu - to. Negativa la escisión de arbutina. Fermenta la glu - cosa, sacarosa y rafinosa 1/3. No fermenta la galacto - sa, ni la maltosa ni la lactosa. Asimila los azúcares que fermenta y también la galactosa. El poder fermenta - tivo es del 15%. Solo se han aislado dos cepas de esta especie por lo que puede ser considerada especie de es - caso interés.

5.- Saccharomyces itálicus Castelli.- En cultivo joven sobre mosto de uva se producen células elípticas, algunas alargadas ligeramente. En agar-malta, las célu - las son más punteadas y esporifican dando ascas con dos esporas y a veces con tres y cuatro. La colonia en ge -

latina-mosto es redonda, gibosa o en forma de cuernacillo, blanca, a veces amarillenta. La pautura en este medio presenta caracteres análogos a las especies anteriormente descritas. El cultivo en mosto de uva es transparente con buen depósito y trazas de anillo superficial. La estria en agar malta es abundante, mucosa - de color blanco grisáceo.

Caracteres fisiológicos: No asimila los nitratos, no desarrolla en presencia de alcohol etílico, y no escinde la arbutina. Fermenta la glucosa, galactosa y maltosa. No fermenta la sacarosa, rafinosa ni lactosa. Asimila los azúcares que fermenta y además la sacrosa.

Solo ha sido aislada una cepa de esta especie - por lo que su presencia puede calificarse de casual. Su poder fermentativo es elevado, 16% en volumen.

6.- Saccharomyces varonae Lodder y Kreger van Rij.

El cultivo joven en mosto de uva presenta células redondeadas, no muy grandes, en parejas o en grupos de varios elementos. En agar-malta, las células son mayores, de forma irregular, muy punteadas, globosas y otras alargadas, muchas provistas de ancho canal y prolongación que en muchas ocasiones conjugan. Ascas originadas por conjugación isogámica o heterogámica, conteniendo dos esporas. El cultivo en mosto de uva se presenta transparente con un anillo bien formado, que al agitar el tubo cae,

enturbando el líquido, con abundante depósito en el fondo y a veces sobre las paredes del tubo. La estria sobre agar-malta es abundante, de color amarillento, tendiendo al marrón, lisa cuando joven, se hace rugosa en el centro al envejecer, apareciendo con un reticulado muy característico. La colonia en gelatina-mosto es redonda, gibosa, de color amarillento y no fluidifica la gelatina. La puntura en el mismo medio se presenta en forma de clavo, con buen desarrollo y ruptura discreta de la masa. La prueba de Rivalier-Seydel es positiva.

Caracteres fisiológicos: No asimila los nitratos ni escinde la arbutina. El desarrollo es escaso o nulo en presencia de alcohol etílico. Fermenta glucosa, sacarosa y rafinosa 1/3. No fermenta la galactosa, maltosa ni lactosa. Algunas cepas fermentan muy ligeramente la maltosa. Asimila la glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa y no asimila la lactosa. Esta especie se ha hallado con un alto porcentaje de frecuencia, adquiriendo pues, notable importancia en la fermentación de los mostos de esta zona. Aunque morfológicamente difiere mucho de la *Torulaspora rosei*, fisiológicamente es muy parecida, y como ella, da escasa acidez volátil al fermentar en pureza el mosto de uva y está dotada de un poder fermentativo algo inferior a la misma.

7.- *Zygosaccharomyces florentinus* Castelli. En cultivo joven sobre mosto de uva, las células son peque-

ñas, aisladas o en parejas, redondas, punteadas, y a veces reunidas en grupitos. En agar malta, las células son redondeadas, aisladas o en parejas, observándose formas conjugantes que dan lugar a ascas conteniendo de una a cuatro esporas. El cultivo en mosto de uva es transparente, con ligero depósito y la colonia en gelatina-mosto es pequeña, ligeramente alzada, redondeada y no fluidifica la gelatina. La estria sobre agar-malta es blanca, mucosa, lisa con una ligera lobulación y buen desarrollo.

Caracteres fisiológicos: No asimila los nitratos ni escinde la arbutina. No crece en presencia de alcohol etílico. Fermenta la glucosa, galactosa, sacarosa y rafinosa completamente. No fermenta la lactosa, asimilando los mismos azúcares que fermenta. Esta especie tiene un poder fermentativo medio y una baja producción de acidez volátil al fermentar en pureza.

8.- Torulaspore rosei Guilliermond.- En mosto de uva las células son redondas, pequeñas, aisladas o en parejas, muchas veces reunidas en grupitos multigermes. En agar-malta se presentan las células aisladas o en parejas, muchas de ellas provistas de una típica protuberancia muy fina que nunca llega a conjugarse. Ascas partenogenéticas de una o dos esporas. La esporulación resulta difícil en algunas cepas por lo que fué preciso realizarla en el medio de Gorodkova y en otras hubo que

recurrir a la prueba de Hansen sobre bloques de yeso para lograr la esporulación. El cultivo en mosto de uva se presenta limpio, transparente, con un ligero depósito bien aglutinado. La estria sobre agar-malta es blanca, lisa, algo ténue, lobulada y con discreto desarrollo. La colonia en gelatina-mosto es blanca, gibosa, - radonda o alzada ligeramente, no fluidifica la gelatina. El desarrollo de la puntura en gelatina-mosto es un perfecto clavo.

Caracteres fisiológicos: No asimila los nitratos ni escinde la arbutina. Tampoco desarrolla en presencia de alcohol etílico. Fermenta la glucosa, sacarosa y rafinosa 1/3. No fermenta la galactosa, ni la maltosa y tampoco la lactosa. Asimila la glucosa y sacarosa.

Esta especie ha sido hallada con discreta frecuencia junto al *Saccharomyces veronae* en la segunda fase fermentativa. Esta especie, que se encuentra en todos los mostos examinados hasta ahora en España, es de gran interés para llevar a cabo fermentaciones con otras levaduras en asociación escalar. La producción de acidez volátil es escasa, habiéndose encontrado cepas que solo han dado 0,18 gramos de ácido acético por litro.- Los poderes fermentativos oscilan en torno a los 8-10 grados de alcohol, aunque también hemos hallado alguna cepa capaz de llegar a los 11,5 grados.

9.- Hanseniaspora guilliermondii Pijper.- Las células en mosto de uva son típicamente apiculadas con gemación bipolar, aisladas o en parejas. En agar malta se producen células del mismo tipo, pero con fácil esporificación, observándose ascas con cuatro esporas y otras fuera de las ascas ya que estas rompen fácilmente. La colonia sobre gelatina mosto es gibosa, de color blancoco que fluidifica tardíamente la gelatina. El desarrollo de la puntura en el mismo medio se produce primero en forma de clavo y posteriormente tiene lugar la fluidificación de la masa en forma de embudo. El cultivo en mosto de uva se presenta turbio, con ligero depósito y trazas de anillo con velo incompleto muy tenue. La estria en agar malta es blanca con ligero tinte marrón, con escaso desarrollo y aspecto húmedo.

Caracteres fisiológicos: No asimila los nitratos y escinde de la arbutina. No desarrolla en presencia de alcohol etílico. Fermenta la glucosa solamente y posee un poder fermentativo entre los 3-7 grados. Se han aislado escasas cepas de esta especie y es la primera vez que se ha encontrado en mostos españoles.

LEVADURAS NO ESPORIGENAS

10.- Torulopsis bacillaris (Kroemer et Krumholz) Lodder.- Las células en mosto de uva son pequeñas, alargadas, muy estrechas, caracter que se acentúa en el agar

malta. No esporifica en ninguno de los medios ensayados. La estria sobre agar malta es grisácea y con el tiempo - se va haciendo violácea, lisa, luciente y de márgenes - un poco sinuosos.

Caracteres fisiológicos: No asimila los nitratos ni escinde la arbutina. No desarrolla en presencia del alcohol etílico como única fuente de alimento hidrocarbonado. Fermenta la glucosa, sacarosa y rafinosa - 1/3. Asimila los mismos azúcares que fermenta.

Interviene escasamente en la fermentación de los mostos de esta zona y su poder fermentativo va de 8 al 10,75% en volumen.

11.- Kloeckera apiculata (Rees) Jenke.- En cultivo de mosto las células se presentan aisladas o en parejas gemantes de forma apiculada, las células hijas muy pequeñas, aisladas y de forma ovoideas. En agar malta, las células son de características análogas pero con menos formas con tendencia a la forma redondeada o sea - más alargadas, y la gemación es bipolar. No esporula, en ninguno de los medios habituales. En algunas cepas se observan células con unos gránulos apicales de grasa, muy refringentes, que suelen confundirse con las esporas de otras especies. El cultivo en mosto de uva, se presenta muy turbio con trazas de anillo y depósito sobre las paredes del tubo. La estria sobre agar malta es muy escasa, tenue, de color grisáceo y aspecto muc-

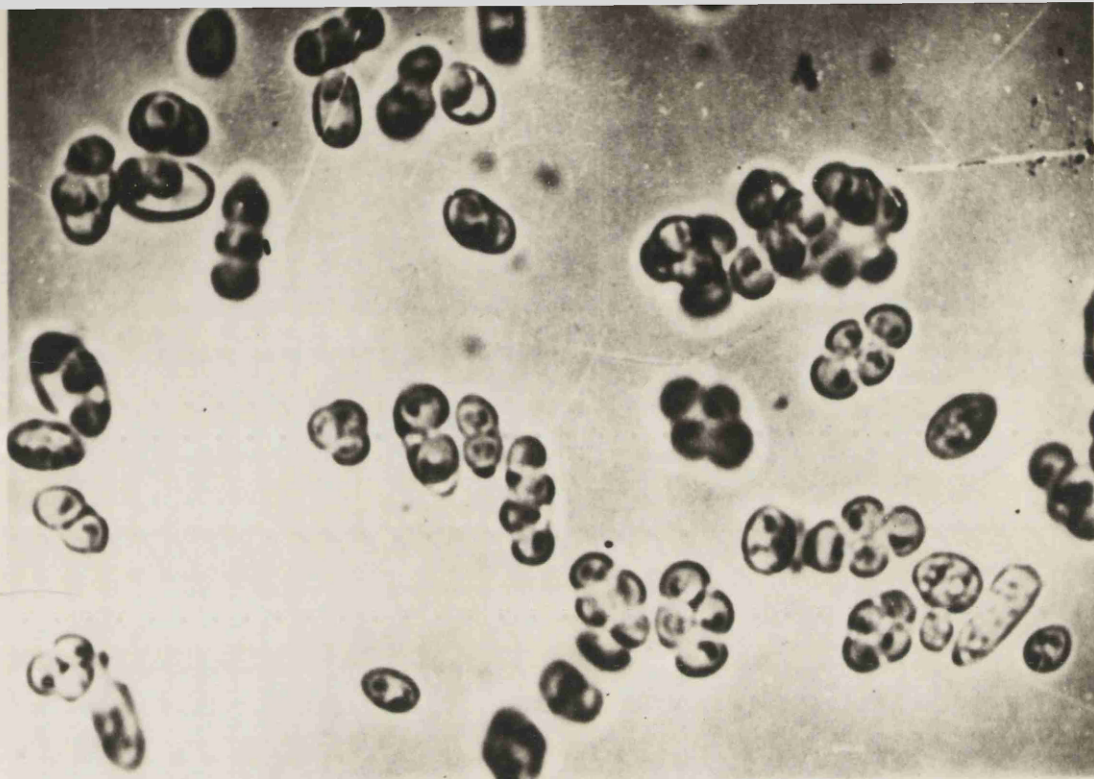
so. La colonia en gelatina mosto es redonda, hundida - en el fondo de un embudo producido al fluidificar la gelatina. La puntura en este mismo medio desarrolla en forma de embudo por producirse, también, una fuerte fluidificación de la masa, el cultivo viejo se presenta con la masa fluidificada en cilindro.

Caracteres fisiológicos: No asimila los nitratos ni escinde la arbutina. No desarrolla en presencia del alcohol etílico. Fermenta únicamente la glucosa. - Presentando un poder fermentativo bajo, en torno al 4% en volumen. Fermenta el mosto de uva con fuerte producción de ácidos volátiles. Han sido muy escasas las cepas aisladas de esta especie.

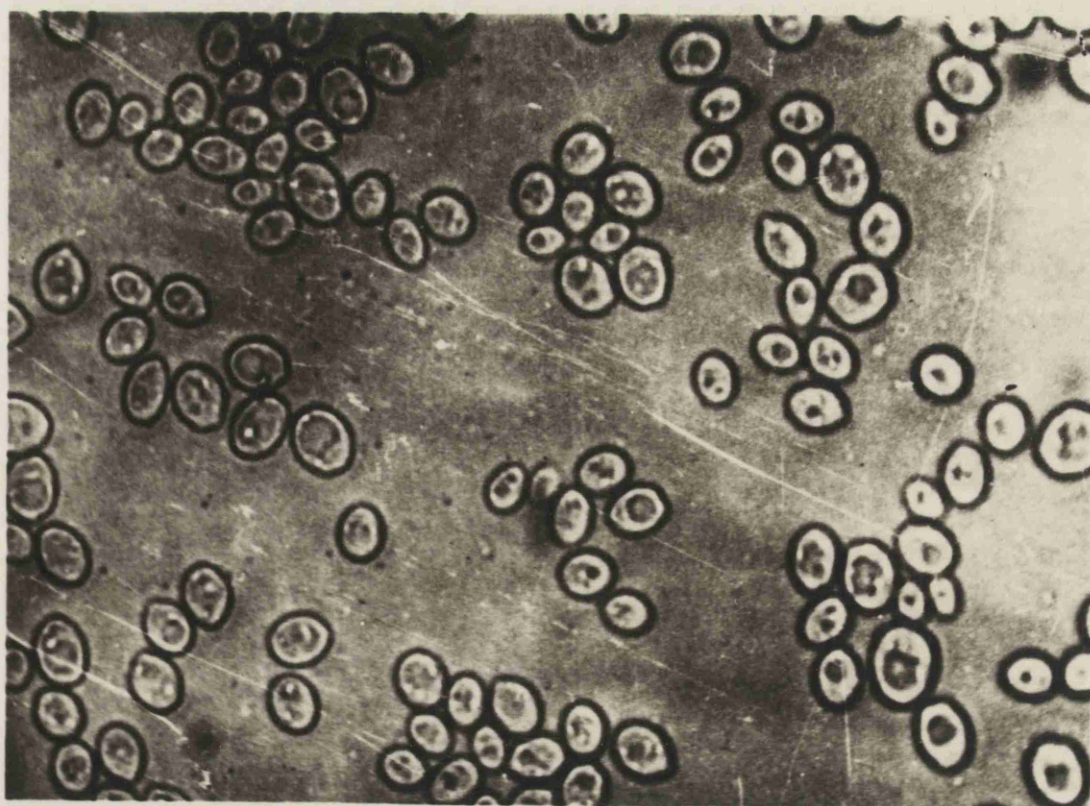
12.- Candida pulherrima (Lindner) Windisch.- Las células en mosto de uva se presentan aisladas o en parejas gemantes, a veces reunidas en grupos de numerosos - elementos, cosa que ocurre más frecuentemente en agar-malta, donde las células son más grandes y presentan en los cultivos viejos unas células gigantes dotadas de un grueso gránulo central de grasa muy refringente. El - cultivo en mosto de uva se presenta transparente con - abundante depósito y escasa fermentación. La estria en agar Malta es abundantísima, de aspecto nívoo, lisa y - muy lobulada. No esporula en ninguno de los medios comunes. En la prueba de Rivalier-Seydal da resultado po

sitivo. La colonia en gelatina mosto es blanca, con - buen desarrollo, gibosa y luciente. La ruptura en gelatina de mosto se presenta al principio con desarrollo - superficial y más tarde con desarrollo en cepa y tardía fluidificación de la masa con ligera coloración rojiza de la masa fluidificada.

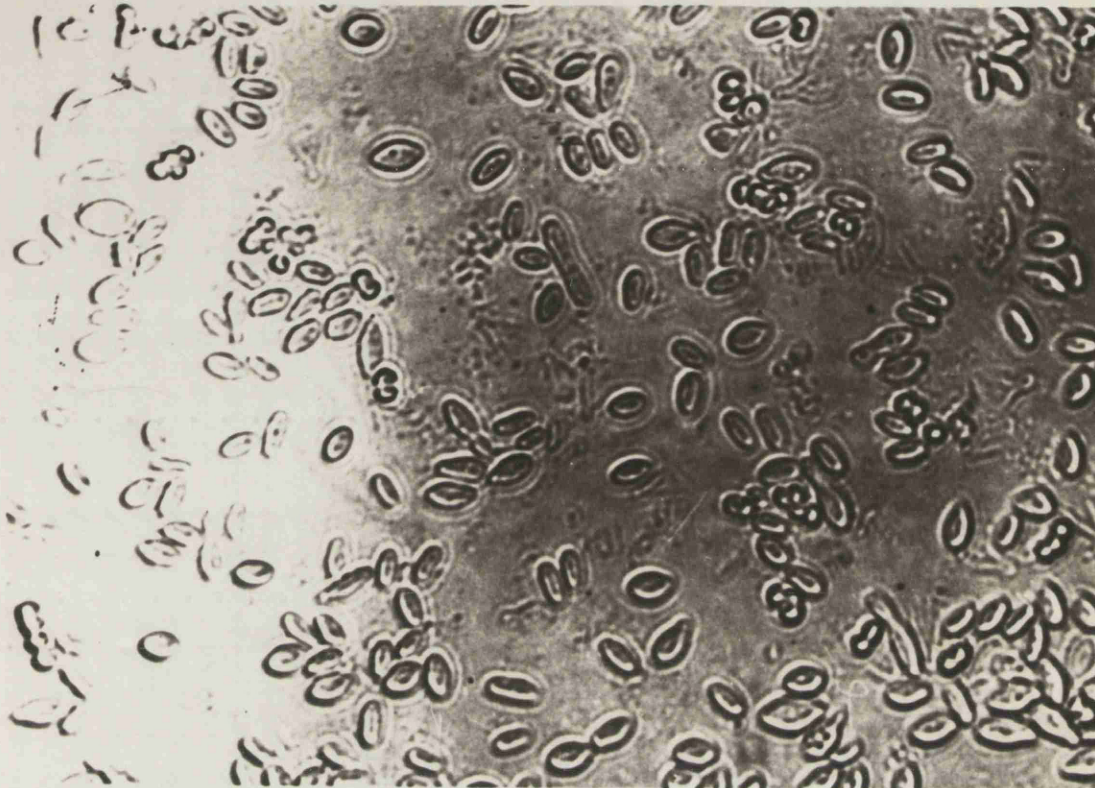
Caracteres fisiológicos: No asimila los nitratos y desarrolla muy bien en presencia del alcohol etílico. Escinde la arbutina. Fermenta solamente la glucosa. Poder fermentativo muy bajo, en torno al 1% en volumen. Sólo ha sido aislada una cepa de esta especie por lo que su presencia en los mostos puede ser considerada casual.



SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS esporificado sobre agar-malta



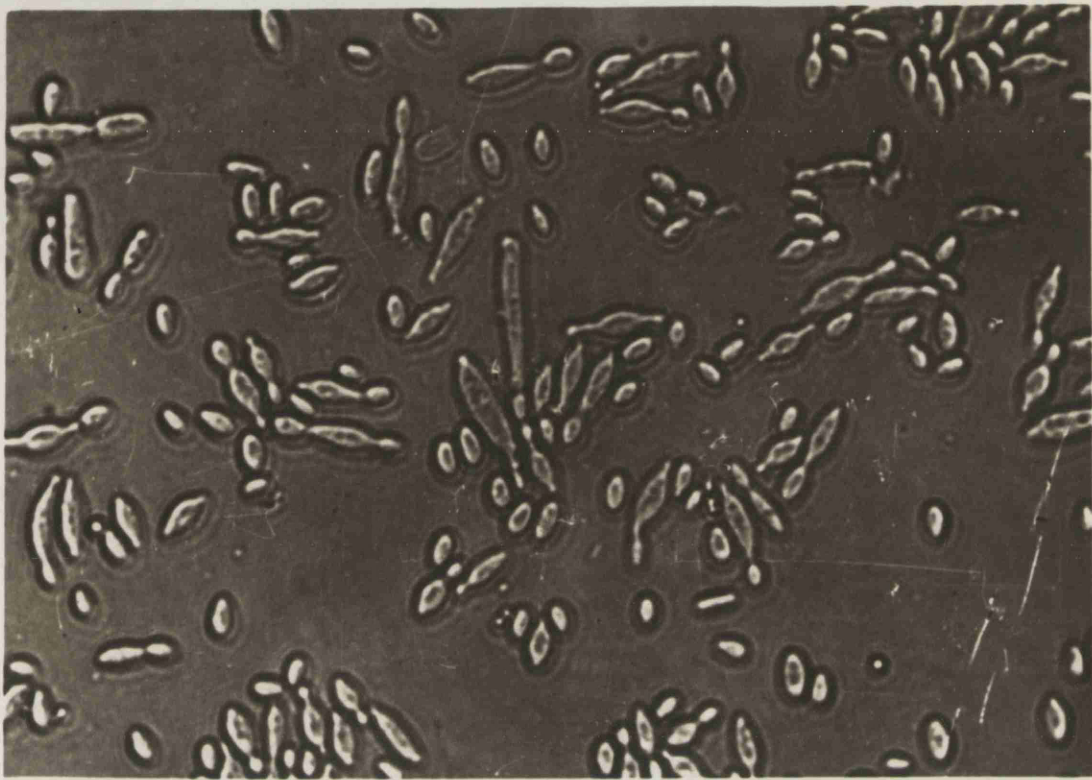
SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS en mosto de uva. Cultivo joven.



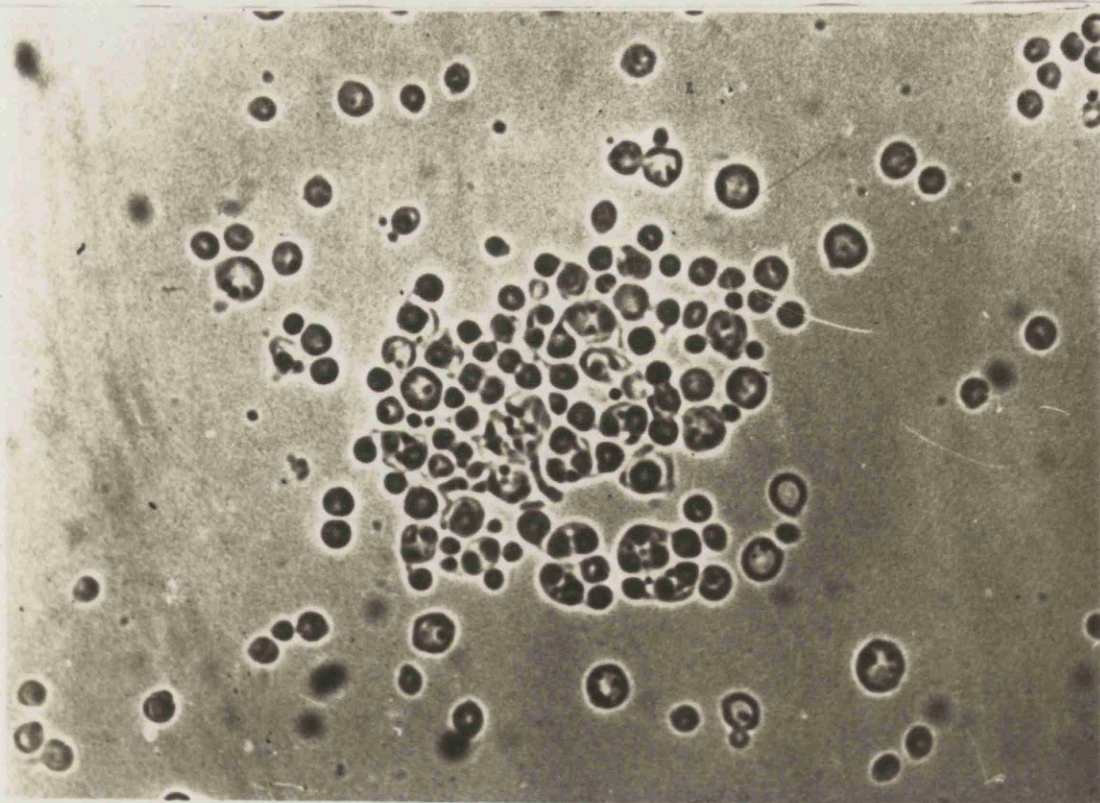
HANSENIASPORA GUILLIERMONDII esporulada. Cultivo en agar-malta.



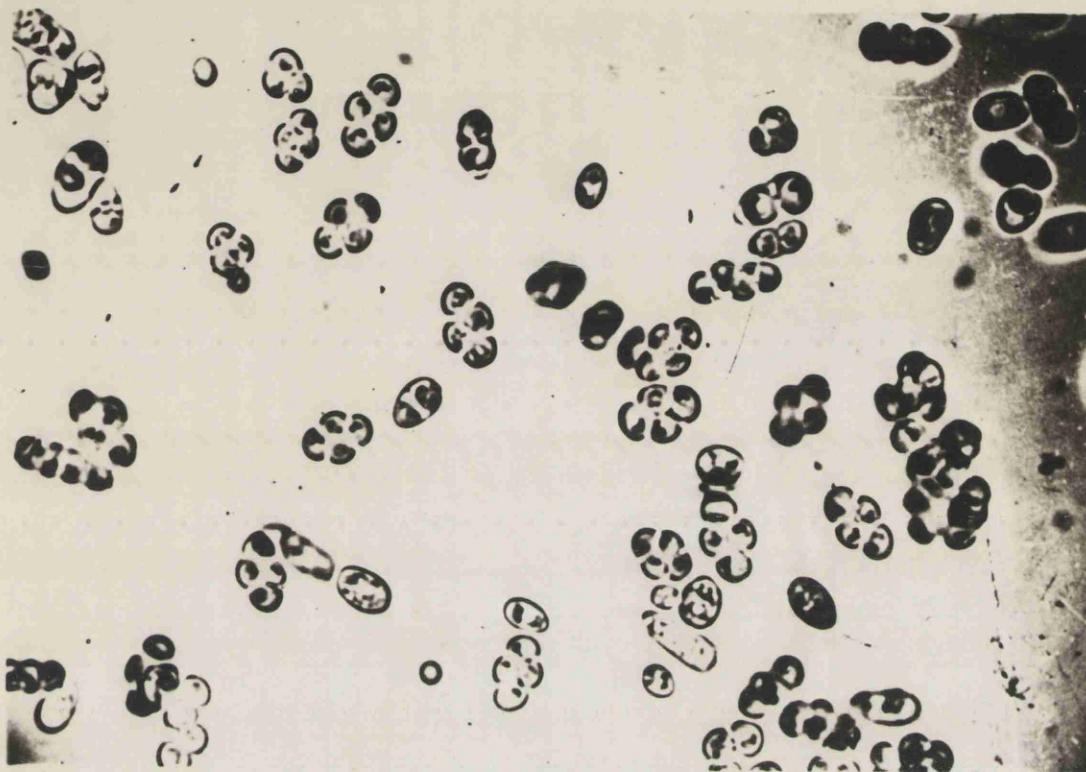
HANSENIASPORA GUILLIERMONDII esporulada. Cultivo en agar-malta. Teñida por el método Castelli.



KLOECKERA APICULATA. Cultivo joven en agar-malta.



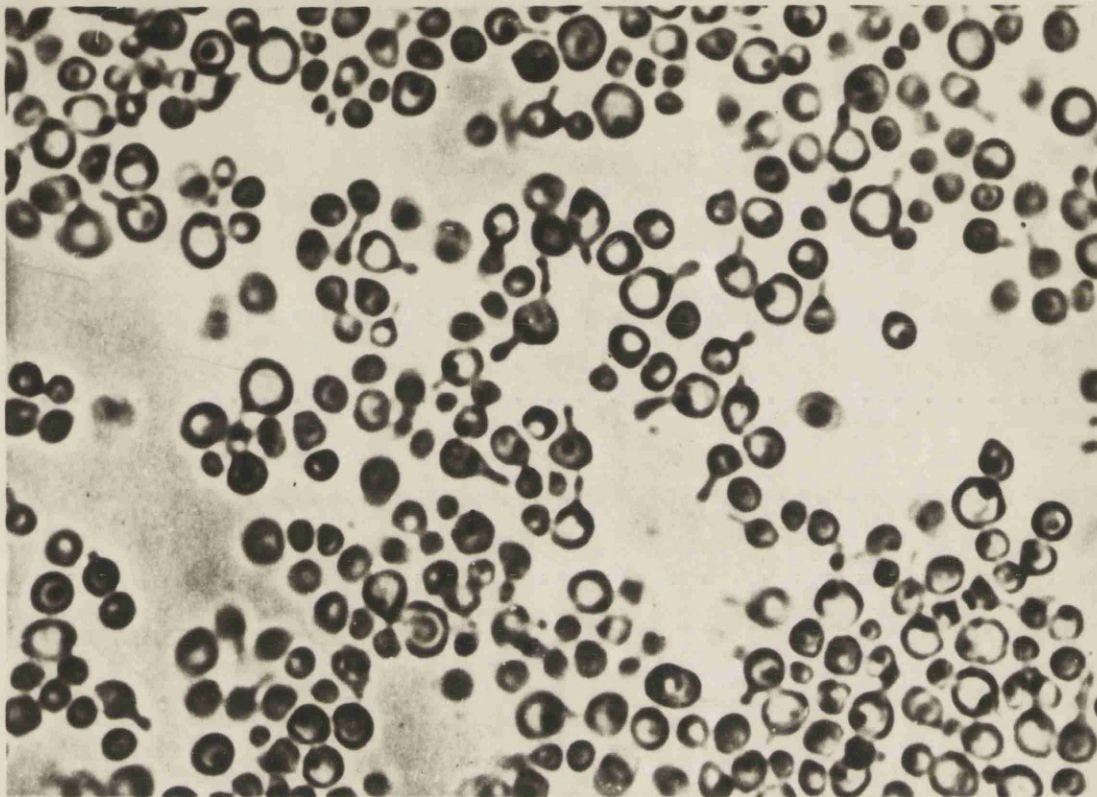
ZIGOSACCHAROMYCES FLORENTINUS. Cultivo esporificado en agar-malta.



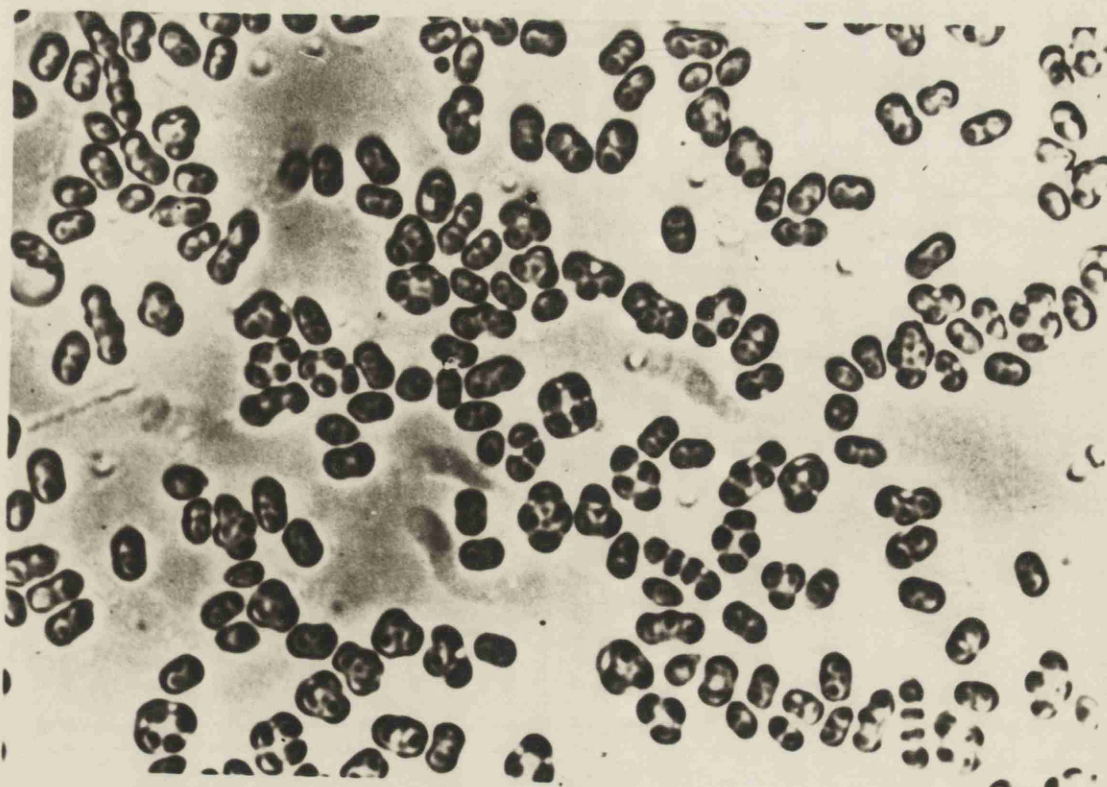
SACCHAROMYCES MANGINI. Cultivo esporulado sobre agar
malta.



SACCHAROMYCES ITALICUS. Cultivo esporulado sobre agar
malta.



TORULASPORA ROSEI. Cultivo esporulado sobre agar-malta.



SACCHAROMYCES OVIFORMIS. Cultivo esporulado sobre agar-malta.

COMENTARIO

De los 16 mostos examinados se han aislado 240 cepas, 80 en cada una de las tres fases fermentativas, pertenecientes a 12 especies de levaduras, cinco de elevado poder fermentativo, cuatro de poder fermentativo - medio y tres de escasa o muy escasa capacidad de fermentación.

Son las siguientes:

- | | |
|---|---|
| - Especies de elevado poder fermentativo. | <i>Saccharomyces ellipsoideus</i>
<i>Saccharomyces mangini</i>
<i>Saccharomyces oviformis</i>
<i>Saccharomyces chevalieri</i>
<i>Saccharomyces italicus</i> |
| - Especies de poder fermentativo medio | <i>Saccharomyces veronae</i>
<i>Torulaspora rosei</i>
<i>Torulopsis bacillaris</i>
<i>Zigosaccharomyces florentinus</i> |
| - Especies de escaso poder fermentativo | <i>Kloeckera apiculata</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
<i>Candida pulcherrima</i> |

La Tabla I, formada con datos tomados del cuadro general, resume el número de cepas de cada especie presentes en el mosto, y la Tabla II su distribución en las tres fases fermentativas consideradas, mientras que en -

la Tabla III se consignan las especies por orden decreciente de frecuencia, haciendo notar su poder fermentativo máximo y mínimo hallado y la producción de ácidos volátil máxima y mínima, al fermentar en pureza mosto de uva.

Llama inmediatamente la atención la gran desproporción de las cepas pertenecientes a especies esporigenas con relación a las no esporigenas (Tabla II), con predominio casi absoluto de las primeras que representa el 95% del total de cepas aisladas. Este hecho, de notable interés naturalista, puede ser atribuido a la sequedad del clima pues las levaduras no esporigenas se perpetúan por las llamadas células duraderas, las cuales requieren para su formación unas condiciones de humedad, que en esta comarca, por su clima, no encuentran.

Las especies no esporigenas llegan a faltar por completo en la tercera fase fermentativa y representan sólo el 10% del total de cepas aisladas en la primera fase, por lo que se puede asegurar que en ningún momento son responsables de la fermentación del mosto.

Es de destacar también el predominio en todas las fases de las especies de elevado poder fermentativo, con la excepción del *Saccharomyces veronae*, de poder fermentativo medio. Se encuentran en un 32% en la primera fase fermentativa, pero esta proporción se hace más del doble en la segunda fase y se triplica, alcanzando el 95%, en la tercera. Todas las especies aisla-

das de Montilla-Moriles pueden producir más alcohol que sus homólogas de las restantes comarcas (20), (21), (37), puede afirmarse, que son además las de poder fermentativa más alto de toda España.

Tienen la máxima intervención en la fermentación *Saccharomyces ellipsoideus* y *Saccharomyces mangini*. El primero, muy común en los mostos españoles, se encuentra en el cien por cien de las muestras en estudio y en las tres fases de cada uno, creciendo en proporción al aumentar la cantidad de alcohol, desde un 15% presente inicialmente, hasta llegar a constituir el 42% de las cepas aisladas en tercera fase. Por su gran capacidad fermentativa, de 13 a 19 grados de alcohol en pureza, resulta necesario para acabar totalmente la fermentación de mostos de tan elevado contenido en azúcar como son los procedentes de uva Pedro Ximénez, pudiendo ser considerada como la especie más importante en el proceso natural de la transformación del mosto de uva.

Casi igual importancia tiene el *Saccharomyces mangini*, presente en un 87,5% de las muestras, el cual abunda mucho más que en otras regiones vinícolas. Fue encontrado en las tres fases, en 14 de los 16 mostos considerados, lo que pone de manifiesto su destacada intervención en la fermentación espontánea. Su poder fermentativo es, prácticamente, igual que el del *Saccharomyces ellipsoideus* y constituye, juntamente con éste, el 80% de las cepas aisladas en tercera fase.

También el *Saccharomyces oviformis* aparece con notable frecuencia. Muy escaso en la primera fase, se impone a continuación participando activamente en la fermentación, habiendo sido aislado en el 56% de las muestras.

En cuanto a las restantes especies de alto poder fermentativo, *Saccharomyces chevalieri* y *Saccharomyces italicus*, fueron aisladas dos cepas de la primera, lo que demuestra su escaso interés, y de *Saccharomyces italicus* apareció solamente una, por lo que su presencia puede y debe ser considerada como casual.

Entre las especies de poder fermentativo medio, tiene un especial interés el *Saccharomyces veronae*, levadura haploide que rebaja a segundo término, en lo referente a frecuencia, a la *Torulaspora rosei*, común a todos los mostos de uva españoles, y que predomina en otras regiones españolas situadas más al norte (20), (21). Aunque morfológicamente esta levadura difiere bastante de la *Torulaspora rosei*, sus caracteres fisiológicos son muy parecidos, produce escasa acidez volátil al fermentar en pureza y está dotada de un poder fermentativo algo menor. No tiene gran resistencia al alcohol por lo que pasa de constituir el 33% en primera fase, al 14% en segunda para quedar reducida a menos del 4% en la fase final. Su importancia es notable, pudiendo afirmarse que sigue en interés al *Saccharomyces ellipsoideus* y *Saccharomyces mangini*, habiendo apa

recido el 75% de las muestras.

La *Torulaspora rosei* parece con discreta frecuencia en el 50% de las muestras. Lleva a cabo fermentaciones de gran pureza, con escasa formación de acidez volátil y acompaña al *Saccharomyces veronae* como levadura típica de la segunda fase, pues las restantes especies de poder fermentativo medio, *Torulopsis bacillaris* y *Zigoseccharomyces florentinus* aisladas, solo están en la primera fase, intervienen escasamente en la fermentación.

Apenas tiene ocasión de participar en la fermentación espontánea las levaduras de escaso poder fermentativo. La *Kloeckera apiculata*, muy abundante en España y que en la Mancha llega a ocupar el segundo lugar de frecuencia después del *Saccharomyces ellipsoideus*, ha sido aislada en proporción muy baja, solo en cinco muestras, actuando por igual en primera y segunda fase.

Asociada en la fase inicial con la anterior, ha sido aislada por primera vez en los mostos españoles la *Hanseniaspora guilliermondii*, levadura apiculata asperígena típica de las regiones cálidas. Su intervención en la fermentación no es de importancia pues solo se presentó en el 19% de las muestras examinadas.

Como casual debe ser considerado el aislamiento de una cepa de *Candida pulcherrima*, levadura propia de climas más fríos o húmedos, lo mismo que ocurre con el *Saccharomyces pastorianus*, especie que no ha sido aislada en esta zona. La falta de estas dos especies consti

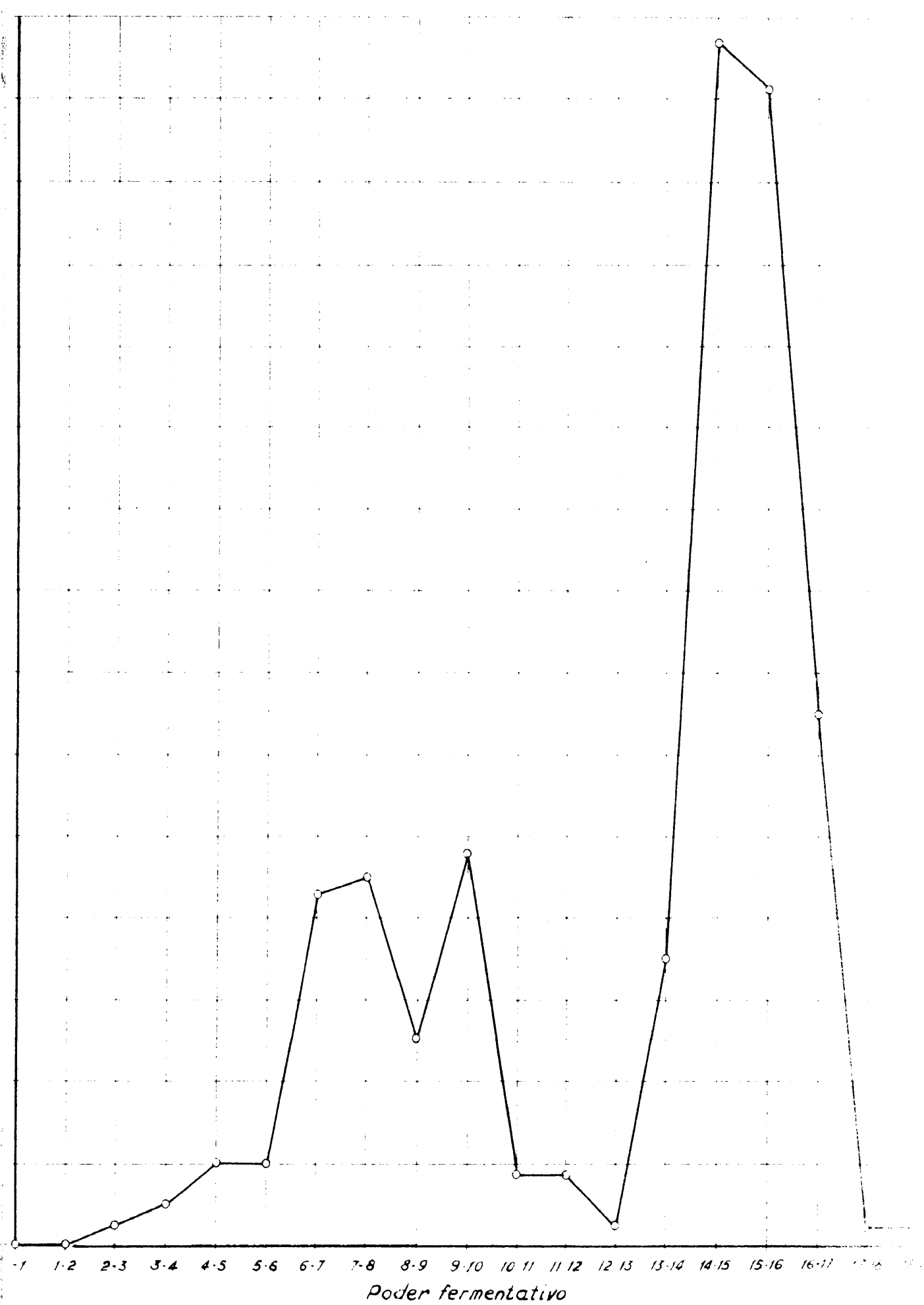
tuye una diferencia fundamental con la flora blastomictica de la Rioja y La Mancha (21), (20).

Recapitulando las características especiales de la comarca de Mentilla-Los Moriles desde un punto de vista ecológico, puede resumirse así:

- a.- Escasa frecuencia de *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima*.
- b.- Aparición de *Hanseniaspora guilliermondii*.
- c.- Notable aumento de *Saccharomyces veronae* y
- d.- Ausencia de *Saccharomyces pastorianus*.
- e.- Activa participación en la fase final del proceso fermentativo del *Saccharomyces manginii*, asociado al *Saccharomyces ellipsoideus*.

En el "gráfico de zona", se representa la difusión de las levaduras en la región en función de sus poderes fermentativos. Este gráfico presenta una gran semejanza con el obtenido por Capriotti en la Calabria (8).

Puede apreciarse por medio de este gráfico el predominio de cepas de elevado poder fermentativo, correspondiendo el máximo al poder fermentativo comprendido entre 14 y 15 grados.



Número de cepas de las diversas especies en los mostos
de Montilla

Núm. del mosto	Cepas de cada mosto	Saccharomyces ellipsoideus	Saccharomyces manginii	Saccharomyces oviformis	Saccharomyces chevallieri	Saccharomyces italicus	Saccharomyces veronae	Zigosaccharom. florentinus	Torulaspora rosei	Hanseniaspora guilliermondii	Torulopsis bacillaris	Kloeckera apiculata	Candida pulcherrima
1	15	5	7	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-
2	15	7	7	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
3	15	4	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-
4	15	1	2	-	-	-	10	-	2	-	-	-	-
5	15	8	4	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-
6	15	8	6	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
7	15	6	4	1	-	1	1	2	-	-	-	-	-
8	15	4	3	-	-	-	4	-	1	-	-	3	4
9	15	5	3	-	1	-	4	-	-	-	1	1	-
10	15	6	1	4	-	-	3	-	-	-	1	-	-
11	15	6	-	4	-	-	-	-	-	4	-	1	-
12	15	2	2	4	-	-	1	-	2	1	-	2	1
13	15	1	4	1	-	-	6	-	3	-	-	-	-
14	15	4	7	1	-	-	1	1	1	-	-	-	-
15	15	6	6	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
16	15	3	4	3	-	-	3	-	-	1	-	1	-

Total. 240 76 60 21 2 1 47 3 12 6 3 8 1

T A B L A II

Frecuencia de las especies en las distintas fases de la fermentación de los mostos de Mortilla.

Especies aisladas	Fase I	Fase II	Fase III
Kloeckera apiculata.....	4	4	-
Torulopsis bacillaris.....	3	-	-
Candida pulcherrima.....	1	-	-
Total de cepas no esporígenas.....	8	4	0
Saccharomyces ellipsoideus.....	12	30	34
Saccharomyces mangini.....	12	18	30
Saccharomyces oviformis.....	1	10	10
Saccharomyces chevalieri.....	1	-	1
Saccharomyces italicus.....	-	-	1
Saccharomyces veronae.....	33	11	3
Zigosaccharomyces florentinus...	3	-	-
Torulaspora rosei.....	5	6	1
Hanseniaspora guilliermondii....	5	1	-
Total de cepas esporígenas.....	72	76	80
TOTAL DE CEPAS.....	80	80	80
Cepas referibles a especies esporuladas...		228	(95%)
" " " no esporuladas..		12	(5%)

Frecuencia de las distintas especies en Montilla. Su poder fermentativo y producción de acidez volátil.

ESPECIES AISLADAS.	Mostos en que se aisló la especie	Porcentaje	Núm. de cepas aisladas	Porcentaje	Alcohol (g)		Ac. volátil (g/l)	
					Máxima	Mínima	Máxima	Mínima
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	16	100,0	76	31,3	19,0	13,2	1,53	0,65
<i>Saccharomyces manginii</i>	14	87,5	60	25,0	17,2	13,2	1,65	0,46
<i>Saccharomyces veronae</i>	12	75,0	47	19,5	10,0	6,2	0,88	0,29
<i>Saccharomyces oviformis</i>	9	56,3	21	8,7	17,0	14,2	1,43	0,49
<i>Torulaspora rosei</i>	8	50,0	12	5,0	11,5	6,0	0,59	0,18
<i>Kloeckera apiculata</i>	5	31,3	8	3,3	6,7	3,5	1,41	0,98
<i>Torulaspora bacillaris</i>	3	18,7	3	1,2	10,7	8,0	1,06	0,88
<i>Saccharomyces chevalieri</i>	2	13,1	2	0,8	15,0	15,0	1,06	0,98
<i>Zigosaccharomyces florentinus</i> ...	2	13,1	3	1,2	8,2	7,5	1,23	0,88
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	3	18,7	6	2,5	7,0	3,7	0,82	
<i>Saccharomyces italicus</i>	1	6,3	1	0,4	16,0		0,18	
<i>Candida pulcherrima</i>	1	6,3	1	0,4	2,2			

IIa.- SELECCION DE CEPAS PARA SU APLICACION INDUSTRIAL

Como hemos indicado en los ANTECEDENTES HISTORICOS, fué Muller-Thurgau el que siguiendo las ideas de Hansen - acerca del uso de cultivos puros de levaduras en la industria de la cervecería, aplicó esta técnica a la vinificación, extendiéndose rápidamente, y así el alemán Wortmann estableció en Geisenheim una estación para la obtención de cultivos puros ya en 1894 (40).

Después, se suceden los estudios de una serie de - investigadores entre los que destacan Martinsaud (26), Ventre (49), Castelli (16), Graff (31), Marques-Gómez (47).- Los resultados obtenidos, tanto por éstos como el conjunto de industrias que ponen en práctica esta técnica, no son - totalmente concordantes, no siempre los vinos obtenidos - por medio de levaduras seleccionadas son superiores a los que se obtienen por medio de una fermentación espontánea, sin embargo se reconoce actualmente que los mejores resultados son los obtenidos con levaduras aisladas y seleccionadas en los mostos y vinos de la misma región en la que - posteriormente, van a ser empleadas.

La fermentación con una levadura seleccionada, fermentación en pureza, está siempre a cargo de una sola especie de levadura, hemicalcohólica, de rendimiento alcohólico elevado y una producción de acidez volátil baja.

Entre todas las cepas aisladas, elegimos un conjunto de ellas representativas de cada una de las fases de la fermentación.

Estas cepas, junto con sus características enoló
gicas más destacadas, son:

<u>Cepas</u>	<u>Especies</u>	<u>Pod.ferm.</u>	<u>Ac.Vol.</u>
134	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	17,0	1,06
148	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	17,0	1,00
210	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	19,0	0,72
59	<i>Saccharomyces mangini</i>	15,75	1,23
217	<i>Saccharomyces mangini</i>	16,25	0,98
144	<i>Saccharomyces oviformis</i>	17,0	0,82
227	<i>Saccharomyces oviformis</i>	17,0	0,85
105	<i>Saccharomyces italicus</i>	16,0	0,82
131	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	15,0	1,06
212	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	15,5	0,98
37	<i>Saccharomyces veronae</i>	9,5	0,29
228	<i>Saccharomyces veronae</i>	10,0	0,26
107	<i>Torulaspora rosei</i>	10,75	0,41
174	<i>Torulaspora rosei</i>	11,25	0,18
155	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	8,0	0,88
233	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	7,0	1,16
229	<i>Kloeckera apioulata</i>	4,75	0,98
140	<i>Torulopsis bacillaris</i>	10,75	1,06

De todas estas cepas, y usando como criterio selectivo los valores que se obtienen en su fermentación - en pureza, escogimos aquellas que pueden tener mayor aplicación en bodega, realizando a continuación pruebas de fermentación en pureza y fermentación escalonada conducentes a reafirmar la selección efectuada y el mayor o menor rendimiento en cada modalidad de fermentación.

Para ello, a partir de una pátina reciente de cada una de ellas, se preparó un "pie de cuba" con 250 centímetros cúbicos de mosto estéril y a las 48 horas, cuando el mosto estaba en plena fermentación, se sembró en recipientes de 10 litros de capacidad conteniendo cada uno 6 litros de mosto de uva esterilizado previamente con metabisulfito potásico y posteriormente desulfitado (46), y de la siguiente composición:

Azúcar	15,0 grados Baumé
Acidez total	4,9 gr/l. Ac. tart.
Anhidrido sulfuroso total	150,0 mgr/l
pH	3,4

Mientras duró la fermentación, se mantuvieron estos recipientes en un local a 16-18 grados.

La fermentación se inició, en general, con gran rapidez, alrededor de las 48 a 60 horas de sembrados, - manteniéndose a ritmo parecido y sin decaer en ningún momento, excepción hecha de las cepas pertenecientes a

las especies *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata* y *Tarulopsis bacillaris*. En éstas, la fermentación no tuvo lugar ya que la dosis de 150 mgr/l de anhídrido sulfuroso produce su total inhibición. inhibición muy beneficiosa en bodega dado el metabolismo heterofermentativo de estas levaduras que rebajan la calidad del vino resultante.

La clarificación espontánea de los mostos fermentados también fué en general muy rápida y especialmente favorable con las cepas 134, 59, 217, 227, 131 y 228. - Siendo éste un carácter de gran importancia en la técnica aplicativa de bodega.

A los 15 días de iniciada la fermentación y al término de la misma, se efectuaron los análisis de acidez total, acidez volátil, alcohol y acetaldehído, siguiendo las técnicas indicadas al final de esta Parte.

Los resultados de estos análisis se dan en las Tablas siguientes.

En cada una de las tablas se especifican los resultados a los 15 días y al final de la fermentación, señalándose con una (x) aquéllas levaduras que presentan unos resultados más favorables para su aplicación industrial.

TABLA IV

ACIDEZ TOTAL EN GR/L DE ACIDO TARTARICO

<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>	<u>15 días</u>	<u>Final</u>
134	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	5,25	5,62
148	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	5,4	6,0
210	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	5,4	6,0
59	<i>Saccharomyces mangini</i>	5,2	6,2
217	<i>Saccharomyces mangini</i>	5,4	6,2
144	<i>Saccharomyces oviformis</i>	4,6	5,4
227	<i>Saccharomyces oviformis</i>	4,8	5,9
105	<i>Saccharomyces italicus</i>	4,3	5,3
131	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	5,5	6,1
212	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	5,4	6,4
37	<i>Saccharomyces veronas</i>	5,1	5,3
228	<i>Saccharomyces veronas</i>	5,1	5,4
107	<i>Torulaspora rosei</i>	5,0	5,5
174	<i>Torulaspora rosei</i>	5,2	5,6
155	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	5,0	5,0
233	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	4,9	4,9
229	<i>Kloeckera apiculata</i>	4,9	4,9
140	<i>Torulopsis bacillaris</i>	4,9	4,9

TABLA V

GRADOS DE ALCOHOL OBTENIDO

<u>Cepa</u>	<u>Especie</u>	<u>15 días</u>	<u>Final</u>	
134	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	12,5	14,1	(x)
148	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	12,7	14,3	(x)
210	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	12,6	13,1	
59	<i>Saccharomyces mangini</i>	11,4	14,4	(x)
217	<i>Saccharomyces mangini</i>	12,9	14,2	(x)
144	<i>Saccharomyces oviformis</i>	12,2	14,4	(x)
227	<i>Saccharomyces oviformis</i>	11,7	13,6	(x)
105	<i>Saccharomyces italicus</i>	9,15	9,4	
131	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	10,6	13,9	(x)
212	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	13,6	14,1	(x)
37	<i>Saccharomyces veronae</i>	6,8	7,8	
228	<i>Saccharomyces veronae</i>	7,2	8,15	
107	<i>Torulaspora rosei</i>	6,2	7,5	
144	<i>Torulaspora rosei</i>	6,2	7,0	
155	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	-	-	
233	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	-	-	
229	<i>Kloeckera apiculata</i>	-	-	
140	<i>Torulopsis bacillaris</i>	-	-	

TABLA VI

ACIDEZ VOLATIL EN GR/L DE ACIDO ACETICO

<u>Cepa</u>	<u>Especie</u>	<u>15 días</u>	<u>Final</u>	
134	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	0,48	0,97	(x)
148	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	0,96	1,4	
210	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	0,48	1,6	
59	<i>Saccharomyces mangini</i>	0,90	1,8	
217	<i>Saccharomyces mangini</i>	0,72	1,21	(x)
144	<i>Saccharomyces oviformis</i>	0,66	1,36	
227	<i>Saccharomyces oviformis</i>	0,76	1,26	(x)
105	<i>Saccharomyces italicus</i>	0,67	1,08	(x)
131	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	0,54	1,26	(x)
212	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	1,17	1,28	
37	<i>Saccharomyces veronae</i>	0,20	0,34	
228	<i>Saccharomyces veronae</i>	0,2	0,28	(x)
107	<i>Torulaspora rosei</i>	0,3	0,97	
174	<i>Torulaspora rosei</i>	0,4	0,91	(x)
155	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	-	-	
233	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	-	-	
229	<i>Kloeckera apiculata</i>	-	-	
140	<i>Torulopsis bacillaria</i>	-	-	

TABLA VII

ACETALDEHIDO EN MGR/LITRO

<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>	<u>15 días</u>	<u>Final</u>	
134	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	83,7	87,2	(x)
148	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	78,3	74,7	
210	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	80,1	90,8	(x)
59	<i>Saccharomyces mangini</i>	89,0	116,0	(x)
217	<i>Saccharomyces mangini</i>	62,3	65,6	
144	<i>Saccharomyces oviformis</i>	69,4	69,5	
227	<i>Saccharomyces oviformis</i>	49,8	47,6	
105	<i>Saccharomyces italicus</i>	49,8	72,1	
131	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	117,0	107,0	(x)
212	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	38,7	49,2	
37	<i>Saccharomyces veronae</i>	30,2	42,0	
228	<i>Saccharomyces veronae</i>	32,0	39,9	
107	<i>Torulaspore rosei</i>	45,6	56,2	
174	<i>Torulaspore rosei</i>	44,2	50,2	
155	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	-	-	
233	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	-	-	
229	<i>Kleeckera apiculata</i>	-	-	
140	<i>Torulopsis bacillaris</i>	-	-	

A la vista de estos resultados fué fácil escoger las cepas de más elevada capacidad en cuanto a producción de alcohol. La mayoría de las cepas en estudio lo producen en gran cantidad pero presentan, generalmente, el inconveniente de producir a la vez gran cantidad de acidez volátil por lo que para hacer la selección definitiva se tuvo en cuenta también este índice, como puede verse en la Tabla VI, es muy bajo en las cepas 134, 217, 227, 105, 131, 37 y 228 y de éstas con gran producción de alcohol tenemos: 134, 217, 227, 131. En definitiva son estas cuatro las que se escogieron como de gran valor práctico. - También se ha escogido la cepa número 228, *Saccharomyces veronae* que aunque produce muy poco alcohol, unos ocho grados como máximo, también origina muy poca acidez volátil, lo que la hace especialmente adecuada para los ensayos de fermentación escalar.

**IIf.- ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA FERMENTACION
ESCALAR Y LA FERMENTACION EN PUREZA**

Una vez seleccionadas, por las pruebas anteriormente descritas, aquellas cepas que tienen mayor valor - para ser usadas en cultivo puro, se realizan a continuación unos ensayos de fermentación en pureza y de fermentación escalonada con dichas cepas, con objeto de ver la mayor o menor utilidad de cada una de las dos modalidades de fermentación.

Como se ha indicado anteriormente, la fermentación en pureza consiste en el empleo de una sola levadura mientras que en la fermentación escalonada, o escalonada, se utilizan dos.

Esta fermentación, ideada por Verona (59) y estudiada por diversos investigadores como Cantarelli (2), - Iñigo (34) consiste en iniciar la fermentación del mosto con una especie de levadura de gran pureza fermentativa y poder alcoholígeno medio que, aunque no desdoble totalmente los azúcares presentes, tampoco acumula en el medio altas concentraciones de ácidos volátiles; a los pocos días la fermentación se completa con una levadura - perteneciente a cualquier especie del género *Saccharomyces* dotada de alto poder fermentativo.

En nuestro caso, utilizamos las cuatro cepas del género *Saccharomyces* seleccionadas por su gran producción de alcohol y relativamente poca producción de acidez volátil y utilizando para el inóculo inicial la cepa 228 - de *Saccharomyces veronae* seleccionada sobre las 107 y 174

de *Torulaspora rosei* por su menor producción de acidez volátil.

Tanto en el caso de la fermentación en pureza -- como en el de la fermentación escalonada será necesario la esterilización técnica del mosto que ha de fermentarse, para eliminar del medio toda la población mixta de especies bacteriológicas, es entonces cuando el sustrato -- queda en condiciones de que desarrollen su actividad vital la especie o especies seleccionadas, respectivamente.

La esterilización en bodega se lleva a cabo por adición de dosis adecuadas de anhídrido sulfuroso, determinadas en cada caso por diversos factores: composición del mosto, estado epidémico de la vendimia, técnica y local de la fermentación, temperatura ambiente de la zona, etc., en consonancia con el tiempo que se ha de mantener el mosto en decantación y con las características propias del producto que se quiere elaborar.

En la Selección efectuada entre las cepas en estudio, hemos tenido en cuenta también este factor y se ha visto como la dosis de 150,0 mgr de anhídrido sulfuroso total, sirve para inhibir totalmente aquellas levaduras de fermentación no homeoalcohólicas mientras que las seleccionadas soportan esta acción sin menoscabo de su función fermentativa.

La experiencia se llevó a cabo con mosto de uva esterilizado en autoclave y con las siguientes caracte-

rísticas analíticas.

Azúcar	14 grados Baumé
Acidez total	4,9 gr/l en ac. tar.
pH	3,4

El "pie de Cuba", tanto en el caso de las cepas - usadas en pureza como en la fermentación escalár, se prepara tomando un "asa" de la levadura en cuestión, previamente rejuvenecida en agar-malta, y sembrándola en 50 cc. del mismo mosto y dejándolo durante 48 horas a 25°C.

Así, se preparan ocho "pies de Cuba" de la cepa - 228 de *Saccharomyces veronae* con los que se siembran ocho recipientes conteniendo dos litros de mosto y cerrándose a continuación con una válvula Miller de ácido sulfúrico.

La fermentación se controla por medio de pesadas diarias con lo que se conoce la pérdida de anhídrido carbónico, de donde puede deducirse la producción de alcohol; este control se continua durante siete días.

Los valores de esta pérdida de anhídrido carbónico vienen indicados a continuación.

TABLA VIII

<u>Muestra</u>	<u>Especie</u>	<u>Gr de CO₂ producidos</u>	<u>Grados Alcohol</u>
E	Saccharomyces veronas	56	3,7
F	" "	54	3,6
G	" "	65	4,3
H	" "	50	3,3
I	" "	48	3,2
J	" "	65,5	4,3
K	" "	54	3,6
L	" "	54,5	3,6

Al término de estos siete días, se realizó la valoración de acidez volátil, se obtuvo el valor intermedio de 0,17 gramos de ácido acético por litro.

Seguidamente, éstos recipientes, junto con los nuevos A, B, C, D son sembrados con las cepas que se indican en la Tabla IX.

TABLA IX

LEVADURAS UTILIZADAS EN LA FERMENTACION EN PUREZA Y ESCALAR

<u>Maestra</u>	<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>
A	134	S. ellipsoideus
B	217	A. mangini
C	227	S. oviformis
D	131	S. chevalieri
E	228-134	S. veronae- S. ellipsoideus
H	228-134	S. veronae- S. ellipsoideus
F	228-217	S. veronae- S. mangini
I	228-217	S. veronae- S. mangini
G	228-227	S. veronae- S. oviformis
K	228-227	S. veronae- S. oviformis
J	228-131	S. veronae- S. chevalieri
L	228-131	S. veronae- S. chevalieri

El curso de la fermentación se sigue mediante pesada diaria.

La fermentación se desarrolla con menos actividad en aquellos mostos sembrados en escalar que en los sembrados en pureza pero en conjunto, la fermentación escalar — tiene lugar con gran regularidad, caracter interesante de este tipo de fermentación; por el contrario, los fermentados en pureza lo hacen con gran actividad en los primeros días, pero decayendo más rápidamente y concluyendo antes, pero — y he aquí un dato de gran importancia — sin consumir totalmente, y en ouantia menor que los en escalar, — los azúcares del medio y obteniéndose por tanto un rendimiento inferior en alcohol, como se comprueba en los datos reseñados en las Tablas.

Es más, la diferencia en la rapidez de fermentación no es muy elevada, ya que incluyendo los siete días en que actua sola la cepa previa de la escalar la cifra — más desfavorable da en total 13 días pero obteniéndose en este caso una cantidad de alcohol mayor (41,22).

TABLA X

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>Días de fermentación</u>	
A	Pureza	134	30	
E	Escalar	228-134	33	
H	Escalar	228-134	30	31,5
B	Pureza	217	28	
F	Escalar	228-217	34	
I	Escalar	228-217	35	34,5
C	Pureza	227	43	
G	Escalar	228-227	48	
K	Escalar	228-227	42	45
D	Pureza	131	48	
J	Escalar	228-131	41	
L	Escalar	228-131	40	40,5

TABLA XI

PERDIDA TOTAL DE ANHIDRIDO CARBONICO

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>Gramos</u>
A	Pureza	134	170
E	Escalar	228-134	203,5
H	Escalar	228-134	222,5
B	Pureza	217	173
F	Escalar	228-217	210,5
I	Escalar	228-217	202,5
C	Pureza	227	181
G	Escalar	228-227	197
K	Escalar	228-227	195,5
D	Pureza	131	177
J	Escalar	228-131	179,5
L	Escalar	228-131	187,5

TABLA XII

ALCOHOL TEORICO

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>Grados</u>	<u>Media</u>
A	Pureza	134	11,2	14,0
E	Escalar	228-134	13,4	
H	Escalar	228-134	14,6	
B	Pureza	217	11,4	13,55
F	Escalar	228-217	13,8	
I	Escalar	228-217	13,3	
C	Pureza	227	11,9	13,0
G	Escalar	228-227	13,0	
K	Escalar	228-227	12,9	
D	Pureza	131	11,6	12,0
J	Escalar	228-131	11,8	
L	Escalar	228-131	12,3	

TABLA XIII

AZUCAR NO FERMENTADO GR/LITRO

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>Gramos</u>	
A	Pureza	134	84	
E	Escalar	228-134	50	
H	Escalar	228-134	30,5	40,2
B	Pureza	217	79	
F	Escalar	228-217	42,75	
I	Escalar	228-217	51,5	47,1
C	Pureza	227	72,7	
G	Escalar	228-227	56,5	
K	Escalar	228-227	58	57,2
D	Pureza	131	77	
J	Escalar	228-131	74,5	
L	Escalar	228-131	66	70,2

Una vez obtenidos los vinos por estas dos modalidades de fermentación, se determinan en ellos una serie de compuestos químicos que lo caracterizan y valoran. Estos compuestos son: acidez total, acidez fija, acidez volátil, alcohol, azúcar, ácido láctico, acetaldehído, acetal, butilenglicol y pH siguiendo los métodos indicados al final de esta Parte.

Destaca extraordinariamente el hecho de que la acidez volátil de los vinos obtenidos por fermentación escalar es inferior a la de los vinos obtenidos por fermentación en pureza (Tabla XV) esto presenta un gran interés industrial, ya que este carácter junto con el hecho de obtenerse también con esta modalidad de fermentación un mayor rendimiento en alcohol, como puede apreciarse en los datos expuestos en la Tabla XIV, hace este tipo de fermentación muy adecuado para su aplicación en bodega, ya que tanto el alcohol como la acidez volátil, son los dos índices más importantes en la valoración de todo vino, al menos ^{los} de pasto.

Los valores obtenidos para el azúcar residual son inferiores a los deducidos por simple pesada (Tablas XIII y XVI) cosa totalmente lógica por cuanto las fermentaciones de las levaduras no son totalmente homoalcohólicas, pero observándose menor residuo azucarado en los vinos obtenidos por fermentación escalar y dentro de ésta, en la pareja de levaduras *Saccharomyces veronae*-*Saccharomyces ellipsoideus* con sus cepas 228 y 134 respectiva—

mente, que son las que en todos los análisis realizados destacan como de gran valor para su aplicación práctica, muy superior a las otras parejas en estudio, ya de por sí valiosas.

Los valores que se obtienen para la acidez total son prácticamente iguales en ambas modalidades de fermentación, cabe apreciar sin embargo en todos los casos que esta acidez es ligeramente inferior en la fermentación escalar, lo que está de acuerdo con el hecho de que es en esta misma fermentación donde se produce más alcohol produciéndose una mayor precipitación de bitartrato.

En la Tabla XVIII se exponen los valores obtenidos de ácido láctico, puede comprobarse que los vinos obtenidos por fermentación escalar son más ricos en éste que los que se obtienen con fermentación en pureza, las diferencias son apreciables siendo la menor de ellas los 0,25 gramos por litro que existen entre los fermentados de *Saccharomyces ellipsoideus*, en pureza y en asociación con *Saccharomyces veronae*. La mayor diferencia aparece con la cepa 131, *Saccharomyces chevalieri*, con 0,53 gr/l, relacionado con el carácter fermentativo de esta levadura ya que es la que menos alcohol produce, es decir, su fermentación es la menos "hemoalcohólica" de las estudiadas y por tanto producirá mayor cantidad de otros compuestos secundarios.

En los valores de butilenglicol, expuestos en la tabla XXI, ocurre lo contrario que en los de ácido láctico, los valores mayores los tienen los vinos obtenidos en fermentación en pureza, encontrándose la mayor diferencia en los fermentados de la cepa 227, *Saccharomyces oviformis*, con 0,25 gramos por litro.

En la Tabla XIX se exponen los valores hallados para el acetaldehído. Son estos muy pequeños, ya que este se produce esencialmente como consecuencia de la crianza del vino y el que aquí encontramos es un subproducto de la fermentación alcohólica, siendo, salvo en un caso -*Saccharomyces oviformis*- ligeramente superiores en los vinos obtenidos "en escalar".

También los valores hallados para el acetal, que se recogen en la Tabla XX son muy pequeños ya que éste se produce en el "envejecimiento" posterior del vino.

Los valores del pH son prácticamente iguales y los normalmente encontrados en vinos (Tabla XXII).

En resumen, puede afirmarse la superioridad de la llamada fermentación escalar sobre la fermentación en pureza, superioridad que radica en su mayor rendimiento alcohólico, menor contenido en acidez volátil, mayor contenido en ácido láctico y valores prácticamente iguales en los demás compuestos químicos usualmente caracterizados en los vinos y dejando el vino con un residuo azucarado muy inferior al que lo dejan los fermentados

en pureza. Esto unido al mayor contenido alcohólico, reduce el riesgo de infección bacteriana, siendo por tanto conservables con mayor facilidad.

Dado que este trabajo está orientado a la selección de aquellas cepas que se puedan utilizar con gran ventaja por la industria enológica, es evidente que de todas las cepas puestas en estudio es la pareja *Saccharomyces veronae*- *Saccharomyces ellipsoideus* la que mejor puede conducir una fermentación y que con los números 615 y 80, respectivamente pertenecen a la Colección del Departamento de Fermentaciones Industriales.

TABLA XIV

GRADO ALCOHOLICO OBTENIDO

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>Grados</u>	<u>Media</u>
A	Pureza	134	11,8	14,0
E	Escalar	228-134	13,5	
H	Escalar	228-134	14,5	
B	Pureza	217	12,8	14,0
F	Escalar	228-217	14,0	
I	Escalar	228-217	14,0	
C	Pureza	227	12,2	13,2
G	Escalar	228-227	13,4	
K	Escalar	228-227	13,0	
D	Pureza	131	12,2	12,9
J	Escalar	228-131	13,4	
L	Escalar	228-131	12,5	

TABLA XV

ACIDEZ VOLATIL EN GR. AC. ACETICO/LITRO DE VINO

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>Gramos</u>	<u>Media</u>
A	Pureza	134	0,63	0,50
E	Escalar	228-134	0,50	
H	Escalar	228-134	0,50	
B	Pureza	217	0,69	0,57
F	Escalar	228-217	0,57	
I	Escalar	228-217	0,57	
C	Pureza	227	0,94	0,82
G	Escalar	228-227	0,88	
K	Escalar	228-227	0,76	
D	Pureza	131	0,63	0,47
J	Escalar	228-131	0,44	
L	Escalar	228-131	0,50	

TABLA XVI

AZUCAR NO FERMENTADO POR LITRO DE VINO

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>Gramos</u>	
A	Pureza	134	69,5	
E	Escalar	228-134	26,2	
H	Escalar	228-134	7,8	17,0
B	Pureza	217	67,0	
F	Escalar	228-217	20,2	
I	Escalar	228-217	26,8	23,5
C	Pureza	227	62,9	
G	Escalar	228-227	33,8	
K	Escalar	228-227	33,2	33,5
D	Pureza	131	56,8	
J	Escalar	228-131	52,3	
L	Escalar	228-131	39,0	45,6

TABLA XVII

ACIDEZ TOTAL EN GR.AC. TARTARICO/LITRO DE VINO

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>Gramos</u>	
A	Pureza	134	4,5	
E	Escalar	228-134	4,3	
H	Escalar	228-134	4,7	4,5
B	Pureza	217	5,1	
F	Escalar	228-217	5,0	
I	Escalar	228-217	4,1	4,55
C	Pureza	227	5,0	
G	Escalar	228-227	4,4	
K	Escalar	228-227	5,1	4,75
D	Pureza	131	4,7	
J	Escalar	228-131	4,1	
L	Escalar	228-131	4,7	

TABLA XVIII

AC. LACTICO EN GR/LITRO DE VINO

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>Gramos</u>	
A	Pureza	134	0,69	
E	Escalar	228-134	0,89	
H	Escalar	228-134	0,99	0,94
B	Pureza	217	0,89	
F	Escalar	228-217	1,28	
I	Escalar	228-217	1,38	1,34
C	Pureza	227	0,79	
G	Escalar	228-227	1,09	
K	Escalar	228-227	1,19	1,14
D	Pureza	131	1,09	
J	Escalar	228-131	1,48	
L	Escalar	228-131	1,76	1,62

TABLA XIX

ACETALDEHIDO EN MGR/LITRO DE VINO

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>Mgramos</u>	
A	Pureza	134	30,5	
E	Escalar	228-134	39,5	
H	Escalar	228-134	39,5	39,5
B	Pureza	217	28,7	
F	Escalar	228-217	30,5	
I	Escalar	228-217	37,7	34,1
C	Pureza	227	43,1	
G	Escalar	228-227	35,9	
K	Escalar	228-227	35,9	35,9
D	Pureza	131	26,9	
J	Escalar	228-131	34,1	
L	Escalar	228-131	37,7	35,9

TABLA XX

ACETAL EN MGR / LITRO DE VINO

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>Mgramos</u>
A	Pureza	134	9,6
E	Escalar	228-134	-
H	Escalar	228-134	9,6
B	Pureza	217	12,5
F	Escalar	228-217	4,8
I	Escalar	228-217	-
C	Pureza	227	-
G	Escalar	228-227	19,3
K	Escalar	228-227	9,6
D	Pureza	131	4,8
J	Escalar	228-131	-
L	Escalar	228-131	4,8

TABLA XXI

BUTILENGLICOL EN GR / LITRO DE VINO

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>Gramos</u>	
A	Pureza	134	1,08	
E	Escalar	228-134	0,85	
H	Escalar	228-134	0,85	0,85
B	Pureza	217	0,87	
F	Escalar	228-217	0,75	
I	Escalar	228-217	0,90	0,825
C	Pureza	227	1,13	
G	Escalar	228-227	0,80	
K	Escalar	228-227	0,97	0,885
D	Pureza	131	0,90	
J	Escalar	228-131	0,65	
L	Escalar	228-131	0,75	0,70

TABLA XIII

VALORES DEL pH

<u>Muestra</u>	<u>Fermentación</u>	<u>Cepas</u>	<u>pH</u>
A	Pureza	134	3,35
E	Escalar	228-134	3,5
H	Escalar	228-134	3,35
B	Pureza	217	3,4
F	Escalar	228-217	3,45
I	Escalar	228-217	3,4
C	Pureza	227	3,35
G	Escalar	228-227	3,5
K	Escalar	228-227	
D	Pureza	131	3,3
J	Escalar	228-131	3,35
L	Escalar	228-131	3,2

PROCEDIMIENTOS ANALITICOS

Acetal.- Método puesto a punto por Campos (5)

Acidez total.- Ribereau-Gayon y Peynaud (53), pág. 99

Acidez volátil.- Ribereau-Gayon y Peynaud (53), págs.
122, 127, 128

Acido láctico.- Procedimiento de Casas (11)

2,3-butilenglicol.- Peynaud (48), con la modificación
final de Casas (12).

Etanal.- Ribereau-Gayon y Peynaud (52), modificado -
por Casas (12)

Etanol.- Método de Semichon y Flanzky descrito por Ri
bereau-Gayon y Peynaud (53), pág. 35.

Glicerina.- Método de Fleury y Lange descrito por Ri
bereau-Gayon y Peynaud (53), pág. 334.

Azúcares.- Método Bertrand aplicado al vino y descriti
to por Ribereau-Gayon y Peynaud (53), pág.
285.

pH.- Electrometría con electrodo de vidrio.

Anhidrido sulfuroso total.- Método de Ripper descrito
por Ribereau-Gayon y Peynaud (53) pág. 384.

SEGUNDA PARTE

I MICROBIOLOGIA DE LOS VELOS DESARROLLADOS SOBRE VINOS

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Las primeras descripciones de las levaduras encontradas en velos desarrollados sobre vinos, se remontan a los tiempos de Pasteur que, opinaba eran levaduras pertenecientes a la especie *Mycoderma vini*, compartiendo las ideas con Rocques (55) que estudió los velos desarrollados sobre vinos amarillos del Arbois.

Velos blastomicóticos sobre vinos son frecuentísimos en todas las latitudes, originando en los mismos - notables alteraciones conocidas como una enfermedad llamada "flores del vino".

Las levaduras descritas como causantes de esta enfermedad son muy numerosas. Desmazieres, citado por De Rossi (57), describe un *Mycoderma vini*, *Mycoderma cerevisiae* y un *Mycoderma lafarii* en tales vinos.

En el año 1917, De Rossi (56) en un magistral - trabajo sobre micodermas del vino, describe cuatro especies clasificadas en dicho género y que considera como - agentes causantes de esta enfermedad. Estas especies - son: *Mycoderma vini*, *Mycoderma duplex*, *Mycoderma tenax*, *Mycoderma acidificans*; todas estas especies y otros micodermas no suficientemente caracterizados, fueron reunidos por Lodder y Kreger van Rij (42) en una sola especie: *Cándida micoderma*.

Además de éstas, han sido descritas en velos so-

bre vinos afectados de "flores" otras especies como *Pichia membranefaciens*, *Pichia derosii*, *Pichia chianti* — giana, etc., Mas recientemente, Hohl y Cruess (33) en encuentran en velos desarrollados sobre vinos de Jerez y Arbois, una *Torulopsis dactyla* y una *Hansenula saturnus*.

Con los trabajos fundamentales de Marcilla, - Alas y Feduchy (44) se pone en claro que también existen velos sobre vinos constituidos por levaduras que - no son del género *Candida*, *Pichia* o *Hansenula*, sino es pecies esporuladas pertenecientes al género *Saccharomyces* y dotadas de alto poder fermentativo. También lle gan a esta conclusión Protosserdow y Afrikian (51) en su estudio de velos desarrollados sobre vinos de Armenia. Los primeros describen una especie nueva, el *Saccharomyces béticus* y los rusos también por primera vez, dan como nueva especie el *Saccharomyces cheresiensis*.

La reciente revisión sistemática de Lodder y - Kreger van Rij, ya citada, presenta a nuestro juicio - graves inconvenientes en lo relativo a la clasifica — ción de estas especies ya que, no tomando en considera — ción el caracter filmógeno sobre vinos de alta gradua — ción alcohólica, las incluye en la especie *Saccharomyces fermentati* y *Saccharomyces oviformis*, respectiva — mente. Sin embargo, este hecho con las consecuencias - bioquímicas que comporta tiene un grandísimo interés - enológico que valdría por si solo para rebatir el cri —

terio simplista aplicado en este caso por los autores holandeses.

Como investigaciones más recientes sobre microbiología de velos citaremos las de Bidan y Andre - (1) llevadas a cabo en vinos del Jura; las de Cantarelli sobre velos desarrollados espontáneamente sobre tintos italianos (3) y finalmente los interesantes hallazgos de Feduchy y Sandoval en vinos de la zona de Navas del Rey y Rueda (Valladolid) en los que (28) encuentra 43 cepas clasificadas como *Saccharomyces beticus*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cheresiensis* y una especie que solo fermenta y asimila la glucosa, dotada de alto poder fermentativo y que consume la acidez volátil del vino al desarrollar sobre la superficie del mismo. Esta especie coincide con la que describimos en el presente estudio y que al haber sido hallada por vez primera en Montilla proponemos denominar *Saccharomyces Montuliensis*.

LAS ESPECIES QUE FORMAN VELOS ESPONTANEAMENTE

Como exigencia básica para poder adquirir conocimientos sobre los procesos de crianza con fler, figura el estudio microbiológico de los velos de levaduras que se realizó sobre las mismas muestras de mosto que sirvieron para estudiar la flora blastomicroética de las fases fermentativas.

Una vez terminada la fermentación espontánea, en todas las muestras aparecieron velos superficiales sobre los que se llevó a cabo el aislamiento e identificación de los microorganismos constituyentes siguiendo las técnicas que se describen en la Primera Parte - de este trabajo.

Se caracterizaron las siguientes especies:

Saccharomyces beticus Marcilla, Alas y Feduchy

Saccharomyces cheresiensis Prostosserdow y Afrikian

Saccharomyces montuliensis Iñigo

Saccharomyces rouxii Boultroux

Hay que hacer notar que estas especies aisladas en velos espontáneos no se hallaron nunca entre las aisladas en las fases fermentativas, en ninguna de sus tres etapas y que tampoco se han encontrado nunca las especies propias de las fases fermentativas entre las aisladas de los velos blastomicroéticos espontáneos.

DESCRIPCION DE ESTAS ESPECIES

Saccharomyces beticus Marcilla, Alas y Feduchy.- En mosto de uva desarrolla muy regularmente produciendo abundante fermentación. La observación microscópica revela células elípticas aisladas o en parejas gemantes; con frecuencia grupos multigemantes de escasos elementos. El cultivo en mosto a los 30 días de sembrado se presenta limpio, transparente, y con abundante depósito muy compacto, a los 6 y 8 días de terminada la fermentación aparece un velo superficial, rugoso y bien formado.

El cultivo en agar malta se presenta como una pátina blanca cremosa, que a los 20 empieza a tomar coloración parduzca, haciéndose granulosa con aspecto seco. El aspecto microscópico de este cultivo revela células elipsoidales ovoides, muy parecidas a las de la especie Saccharomyces cheresiensis, formando ascas escasas con cuatro ascosporas esféricas, pequeñas.

La punción en gelatina se presenta con desarrollo en clavo sin fluidificación de la masa.

Los caracteres morfológicos, son, en todas especies del género Saccharomyces halladas en los velos, de gran similitud no advirtiéndose diferencias fundamentales que puedan justificar su separación, sin embargo, las diferencias fisiológicas son muy marcadas y

en ellas se apoya la diferenciación de especies; así - en lo que se refiere a la fermentación de azúcares el *Saccharomyces béticus* fermenta solo glucosa, sacarosa, y rafinosa 1/3 y no fermenta maltosa ni galactosa. Asi mila los mismos azúcares que fermenta. Se diferencia en esto del *Saccharomyces cheresiensis* que fermenta y asimila la maltosa. No asimila ni-tratos ni escinde - la arbutina. Desarrolla en presencia de alcohol etíli oo como única fuente carbonada.

El poder fermentativo de esta especie oscila - entre el 11,2 y 18,0 grados de alcohol, hallándose las cepas con valores más altos en esta zona de Moriles-Montilla. La acidez volátil oscila entre el 0,61 y - 1,43 gramos/litros que, como en el *Saccharomyces chere* siensis, son valores siempre superiores a los produci- dos por las especies aisladas en fase fermentativa.

Discusión

Esta especie tiene semejanzas fisiológicas en lo que se refiere a fermentación de azúcares, con el - *Saccharomyces chevalieri* Guilliermond, aunque éste asi- mila también la galactosa. Esta última especie se ha - encontrado en fase fermentativa pero jamás ha formado - velos sobre mostos fermentados por ella misma ni sobre vinos de la misma zona. Inexplicablemente Lodder y Kre ger van Rij no toman en consideración este especie y la

incluyen en *Saccharomyces fermentati*, que fermenta y - asimila la maltosa lo que no sucede en la especie que se describe. Encontramos pues, una verdadera analogia fisiológica con el *Saccharomyces chevalieri*, con la - salvedad de que éste forma velo sobre el vino y el *Saccharomyces chevalieri* no la forma nunca.

Fué descrito y clasificado por Marcilla y colaboradores que lo denominó *Saccharomyces beticus*, raza alfa, en el año 1933 (44).

2.- *Saccharomyces cheresiensis* Prostosserdow y Afrikian.

En cultivo joven sobre mosto de uva aparecen - células elípticas redondeadas de tamaño mediano, algunas globosas, aisladas o en abundantes parejas gemantes, que disminuyen al avanzar la fermentación siendo substituidas por agrupaciones de tipo flucolosas de numerosos elementos. Fermenta el mosto con gran regularidad, dejándolo muy limpio y transparente con depósito muy compacto y abundante. A los 9 - 15 días, mantenido el cultivo a 18 grados aparece el típico velo superficial que en este caso empieza formando pequeños islotes que se van extendiendo hasta soldar sus bordes y llegar a subir por las paredes del tubo. Microscópicamente el velo aparece formado por células ovoideas, con más uniformidad morfológica que durante la fermentación, abundantes parejas gemantes y numerosos grupos floculosos. Jamás se han observado células alargadas ni en cadena.

En agar Malta, en cultivo de 24 - 48 se forman células elípticas redondeadas, otras ovoides, de tamaño mediano, de contenido muy punteado por la abundancia de gránulos metacromáticos. En algunos cultivos viejos se han observado una puntuación extracelulares y algunas células aisladas ligeramente piriformes, en tanto que otras presentan un fino tubo o prolongación que da la impresión de estar tabicado. No esporifica fácilmente en este medio y si lo hace abundantemente sobre bloques de yeso apareciendo ascas de dos, tres o cuatro esporas redondas, gruesas y de paredes lisas.

El aspecto del cultivo es rugoso, seco, de color pardo amarillento, con bordes alargados y lobulados. La punción en gelatina desarrolla en forma de olavo con cabeza muy alzada, que se extiende por la superficie sin producir fluidificación de la masa.

No asimila los nitratos ni escinde la arbutina. Desarrolla en presencia de alcohol etílico. Fermenta y asimila glucosa, maltosa, sacarosa y rafinosa 1/3. - No fermenta galactosa, lactosa ni inulina. El rendimiento al fermentar los azúcares varía según la concentración azucarada, si es baja es menor que al fermentar mostos ricos en azúcar. El poder fermentativo es muy elevado, variando de 12,5 a 18,0 grados. La acidez volátil que produce es en general superior al 1,0 gramos por litro y con frecuencia sobrepasa los 2 gra-

mos por litro. Esta propiedad fisiológica constituye una diferencia fundamental con la especie del género *Saccharomyces* aislada en fase fermentativa.

Las cepas de esta especie aisladas en Montilla-Moriles tienen un poder fermentativo superior a las - aisladas en Jerez, Condado y Aljarafe (36), sin duda - por su adaptación a mostos más azucarados.

Discusión.

Esta especie tiene semejanza fisiológica con - el *Saccharomyces oviformis* Osterwalder en lo referente a su fermentación cualitativa de azúcares. Por esta - razón, Lodder y Kreger van Rij (42) las consideran sinónimas, pues no tienen en cuenta la formación de velo como caracter diferencial. Para nosotros esta facultad tiene especial interés ya que el desarrollo aerobio lleva consigo una serie de funciones fisiológicas que el *Saccharomyces oviformis* no presenta. Se ha comprobado en todas las cepas de *Saccharomyces oviformis* aisladas en esta zona en fase fermentativa, que no forman velos ni sobre mosto fermentado por ella misma, ni sobre vinos locales, con un 6% de alcohol en volumen, esterilizados a vapor fluente, durante media hora o sobre vinos de la misma procedencia, esterilizados por - filtración amicróbica, con 15-15,5 grados alcohólicos. El *Saccharomyces cheresiensis*, por su parte desarrolla perfectamente en nueve días si bien forma un velo me -

nos rugoso sobre vinos de 6 grados.

Entendemos por tanto, que estas dos especies deben ser consideradas como taxonómicamente diferentes, con la reserva de una estrecha filogenesis.

El *Saccharomyces cheresiensis* fué descubierto y clasificado por Prostosserdov y Afrikian (51). También la observó Marcilla (44) que la denominó *Saccharomyces béticus*, raza beta.

3.- *Saccharomyces montuliensis* Iñigo.- El cultivo en mosto de uva después de tres días de sembrado, presenta fermentación abundante que termina a los 20 días, produciéndose la aparición de un velo a los diez días de finalizada la fermentación. Produce depósito compacto que deja muy transparente el líquido.

La observación microscópica de este cultivo - presenta células elíptico redondeadas, gruesas, muy - punteadas y otras células pequeñas, aisladas, en parejas o grupos multigemantes.

El cultivo en agar malta presenta abundante - pátina, color blanco amarillento que tiende a oscurecerse con el envejecimiento, con aspecto rugoso, seco y punteado. La observación al microscopio de este - cultivo, revela células elíptico-ovoidales, aisladas o en parejas, abundantes grupos floculosos, y células punteadas que no forman esporas. En cambio, esporifican bien sobre el bloque de yeso, formándose ascas -

con 2-3-4 esporas.

El poder fermentativo oscila entre 11,9 y 16 - grados, valores muy superiores a los de cepas de esta especie aisladas en las regiones de Aljarafe y Condado (36). La acidez volátil alcanza valores comprendidos entre 0,76 y 1,22 gramos/litro.

Esta especie fermenta sólo la glucosa, ni gún otro azúcar. Asimila, también únicamente, la glucesa. No asimila nitratos ni escinde la arbutina. Y es capaz de crecer sobre etanol como única fuente carbonada.

Discusión

Las especies descritas por Lodder y Kreger van Rij (42) que fermenta sólo la glucosa son:

Saccharomyces melis

Saccharomyces bisporus

Saccharomyces bailli

Saccharomyces acidifaciens

Saccharomyces pastori

En ninguna de ellas, excepción hecha en *Saccharomyces acidifaciens*, se ha observado la aparición de velo. Es ta diferencia fisiológica que estimamos muy importante, justifica la denominación de nueva especie y que se propone con el nombre de *Saccharomyces montuliensis*.

Además el *Saccharomyces acidifaciens*, que precisamente ha sido aislado por nosotros en velos de vi-

no (36), es una especie distinta morfológicamente del - *Saccharomyces montuliensis* porque produce ascas sexuales y debe ser considerado como un *Zigosaccharomyces* y, como tal fué descrito.

El *Saccharomyces pastori* tiene esporas en forma de sombrero, cosa que nunca ha sido observada en la nueva especie propuesta.

El *Saccharomyces baillii* presente células alargadas, reunidas en cadena, lo que tampoco se da en el *Saccharomyces montuliensis*.

Finalmente, el *Saccharomyces melis*, no crece en presencia de etanol como única fuente de carbono y el *Saccharomyces bisporus* presenta un poder fermentativo - muy inferior al de la nueva especie propuesta, *Saccharomyces montuliensis*.

4.- *Saccharomyces rouxii* Boutroux.- El cultivo en mosto de uva después de tres días de sembrado, presenta - abundante fermentación que termina a los 15-20 días, - produciéndose la aparición de un velo a los 10 días de terminada la fermentación. La observación microscópica de este cultivo, revela células elíptico globosas, aisladas o en parejas, abundantes grupos floculosos cuando la fermentación está muy avanzada.

El cultivo en agar malta presenta características muy parecidas a las descritas en las especies anteriores.

Su poder fermentativo está comprendido entre 9 y 18,2 grados siendo los más altos los de las cepas - aisladas en Montilla-Moriles. La acidez volátil oscila entre 1,84 y 1,00 gramos litro.

La diferencia fundamental entre estas especies, como se viene repitiendo a lo largo del trabajo, se refiere a sus caracteres fisiológicos. Esta especie de lavadura, sólo fermenta la glucosa y la maltosa, asimilando los mismos azúcares que fermenta. No fermenta - ni asimila la galactosa, sacarosa ni rafinosa. Tampoco asimila los nitratos ni escinde la arbutina.

Discusión

Esta especie fué hallada en velos por primera vez por Cruess (22) que la incluyó en la especie descrita por Boutroux en 1883 aislada sobre jaraba de frutas. Creemos, sin embargo, que por la descripción que hizo Boutroux, esta especie no forma velos propiamente dichos, aunque sí algunos islotes sobre mostos de cerezas. En la actual descripción de esta especie, que hacen Lodder y Kreger van Rij (42), puntualiza que al crecer sobre extracto de malta forma células redondas o ovales, aisladas o en parejas, en pequeñas cadenas - cortas, formando sedimentos y a menudo un anillo fino, no diciendo nada de la formación de velo y sólomente el que Cruess (22) halla incluido en esta especie la - aislada por él en velos blastomicéticos desarrollados

sobre vinos de Jerez, nos ha inducido a aceptarla con esta denominación.

A continuación se expone el 2º Quadro General en el que se recogen el número de la muestra analizada, la localidad en que se tomó, el sustrato, la fase aeróbica en que se encontraba y el número de cultivo puro en estudio (cepa). A continuación se anota el poder fermentativo y la acidez volátil de cada una de dichos cultivos al fermentar sobre mostos de uva de la zona: sigue el diagnóstico y, finalmente, se anota el grado alcohólico y la acidez volátil de las muestras de vino en las que se hicieron los aislamientos.

CUADRO GENERAL

VELOS DE FLOR

Núm. de la muestra	Localidad	Sustrato	Fase	Cepas	Poder fermentativo (°)	Acidez volátil g/l	DIAGNOSTICO	Alcohol del vino (°)	Acidez volátil del vino g/l
1	Aguilar Montilla	Vino de 30 días	V e l o	1 2 3 4 5	17,5 14,5 15,0 15,7 14,0	1,53 1,53 1,77 1,47 1,84	Saccharomyces rouxii " rouxii " rouxii " rouxii " rouxii	14,0	0,76
2	Ruedos de Montilla			6 7 8 9 10	17,0 17,5 15,7 15,5 17,2	0,61 0,92 1,10 1,35 0,61	Saccharomyces beticus " beticus " cheresiensis " cheresiensis " beticus	14,5	0,60
3	Moriles Altos			11 12 13 14 15	15,0 15,7 17,2 16,2 14,7	1,53 1,59 0,86 0,61 0,86	Saccharomyces cheresiensis " cheresiensis " cheresiensis " cheresiensis " cheresiensis	15,7	1,09

4	Moriles Altos	Vino de treinta días.					V e l o					15,2	1,09
5	Los Ruedos Montilla	16	17	18	19	20	15,5 15,2 17,2 16,2 16,0	1,35 1,47 1,04 0,92 1,04	Saccharomyces " " " "	rouxii rouxii cheresiensis cheresiensis rouxii	10,9	0,33	
6	Ruedos de Aguilar Montilla	21	22	23	24	25	16,5 17,2 16,5 17,5 16,5	1,41 0,98 1,53 1,47 1,41	Saccharomyces " " " "	cheresiensis cheresiensis cheresiensis cheresiensis cheresiensis	13,3	0,38	
7		26	27	28	29	30	16,5 17,5 13,2 14,2 17,7	1,41 0,98 2,08 2,26 1,35	Saccharomyces " " " "	cheresiensis beticus cheresiensis cheresiensis cheresiensis	13,5	0,44	
		31	32	33	34	35	16,7 16,0 15,5 16,5 15,7	1,04 1,35 1,29 1,16 1,29	Saccharomyces " " " "	rouxii rouxii rouxii rouxii rouxii			

8	Sierra de Montilla	Vino de treinta días.	V e l o	36 37 38 39 40	17,2 16,7 17,2 16,5 18,0	0,98 1,16 1,10 1,04 0,86	Saccharomyces " " " "	cheresiensis cheresiensis cheresiensis cheresiensis cheresiensis	13,3	0,16
9				41 42 43 44 45	17,2 16,2 18,0 16,5 17,5	0,92 1,53 0,92 0,92 1,10	Saccharomyces " " " "	cheresiensis cheresiensis beticus cheresiensis cheresiensis	12,9	0,24
10	Monturque (Montilla)			46 47 48 49 50	16,0 16,7 16,2 17,5 17,7	1,53 1,41 1,65 1,35 1,29	Saccharomyces " " " "	cheresiensis cheresiensis cheresiensis cheresiensis cheresiensis	14,3	0,53
11				51 52 53 54 55	15,7 16,7 17,5 16,5 17,5	1,59 1,41 1,10 1,47 0,73	Saccharomyces " " " "	cheresiensis cheresiensis cheresiensis cheresiensis beticus	14,5	0,30

12	Puente Genil	Vino de treinta días:	V e l o	56 57 58 59 60	18,2 15,7 15,7 15,7 16,0	1,65 1,04 1,35 1,22 1,16	Saccharomyces rouxii " " " " " " " "	13,8	0,59
13				61 62 63 64 65	15,7 15,5 15,5 15,7 15,7	1,04 1,22 1,22 1,04 1,10	Saccharomyces rouxii " " " " " " " "	14,2	0,77
14	Ruedos de Montilla			66 67 68 69 70	16,0 15,0 14,7 16,5 15,0	1,22 1,61 1,84 1,59 1,22	Saccharomyces montuliensis rouxii rouxii rouxii rouxii	13,8	1,07
15				71 72 73 74 75	15,2 15,5 15,2 15,2 14,7	1,59 1,71 1,29 1,53 1,53	Saccharomyces cheresiensis rouxii cheresiensis rouxii rouxii	13,7	1,01
16	Ruedos y - Sierra de Montilla.			76 77 78 79 80	16,0 13,7 13,7 18,0 15,5	1,41 1,77 1,71 1,29 1,29	Saccharomyces rouxii " " " " " " " "	13,6	0,30

ECOLOGIA DE LAS ESPECIES

Del cuadro general, anteriormente expuesto se han extraído los datos que componen la Tabla XXIII y en la que se expone el número de cepas de cada una de las especies halladas.

Se advierte claramente un predominio del *Saccharomyces cheresiensis* junto al *Saccharomyces rouxii*, teniendo menor importancia la presencia del *Saccharomyces béticus* y *Saccharomyces montuliensis*. Es interesante hacer notar que no aparece ninguna de las especies de levadura consideradas como nocivas, lo que se explica lógicamente por la alta graduación alcohólica natural de los vinos que se obtienen.

Con objeto de realizar un estudio ecológico completo de todas aquellas levaduras que actúan como agentes de crianza, comparamos los resultados hallados en Montilla-Moriles con los encontrados en Jerez, Aljarafe y El Condado (36). Así, en la Tabla XXIV se recogen los datos referentes a la zona de Jerez; en esta zona predomina la especie *Saccharomyces béticus*, seguida en orden de frecuencia por la especie *Hansenula anomala*, pero hallada esta especie sólo y exclusivamente en uno de los "Pagos" considerados.

También, y con exclusividad en esta zona, hallamos la especie *Zigosaccharomyces acidifaciens*, siempre

sobre muestras con graduación alcohólica inferior a los 11 grados.

En la Tabla XXV se presentan los datos de la zona Aljarafe y El Condado. Aquí, es más frecuente el *Saccharomyces béticus*, seguido con frecuencia por el *Saccharomyces montuliensis*. No aparece el *Saccharomyces rouxii* y aparece la *Candida mycoderma* sobre muestras que contenían aproximadamente 9 grados alcohólicos.

En la Tabla XXVI se resumen los porcentajes de frecuencia de las distintas especies de las tres zonas, anotándose las cantidades de alcohol y acidez volátil máxima y mínima, producidas por las diferentes cepas de cada una de las especies halladas.

En la Tabla XXVII se recoge en una visión de conjunto, la ecología de las distintas especies en las tres comarcas, observándose que el *Saccharomyces béticus* adquiere más importancia en Jerez, El Condado y Aljarafe; que el *Saccharomyces cheresiensis* domina en Montilla-Moriles, mientras que el *Saccharomyces montuliensis* se halla con frecuencia más discreta en todas ellas, siendo la zona de Aljarafe-El Condado, donde se encuentra en mayor abundancia. La *Candida mycoderma* no aparece ni en Montilla-Moriles ni Jerez, y el *Zigosaccharomyces acidifaciens* y la *Hansenula anomala* solo se hallaron en Jerez.

T A B L A X X I I I

Cepas de las diversas especies en los velos formados
sobre vinos de Montilla

Núm. del mosto ...	Cepas de cada mosto	<i>Saccharomyces</i> <i>cheresiensis</i> ...	<i>Saccharomyces</i> <i>rouxii</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>beticus</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>montuliensis</i>
1	5	-	5	-	-
2	5	2	-	3	-
3	5	5	-	-	-
4	5	2	3	-	-
5	5	5	-	-	-
6	5	4	-	1	-
7	5	-	5	-	-
8	5	5	-	-	-
9	5	4	-	1	-
10	5	5	-	-	-
11	5	4	-	1	-
12	5	-	5	-	-
13	5	-	5	-	-
14	5	-	4	-	1
15	5	2	3	-	-
16	5	-	5	-	-
Total...	80	38	35	6	1

Cepas de las diversas especies en los velos formados
sobre vinos de Jerez

PAGO	Nº del mosto	Cepas de cada mosto	Saccharomyces beticus	Hansenula anomala	Saccharomyces montuliensis	Zigosacchar. acidificaciens	Saccharomyces cheresiensis..	Saccharomyces rouxi
17 Carrascal	17	5	5	-	-	-	-	-
	18	5	5	-	-	-	-	-
	19	5	5	-	-	-	-	-
	20	5	5	-	-	-	-	-
	21	5	5	-	-	-	-	-
Macharnudo	22	5	4	-	-	-	-	1
	23	5	3	-	-	-	2	-
	24	5	3	-	2	-	-	-
	25	5	-	-	2	-	2	1
	26	5	5	-	-	-	-	-
Sanlúcar	27	5	5	-	-	-	-	-
	28	5	-	-	-	5	-	-
	29	5	5	-	-	-	-	-
	30	5	5	-	-	-	-	-
	31	5	5	-	-	-	-	-
Balbaina	32	5	-	5	-	-	-	-
	33	5	-	5	-	-	-	-
	34	5	-	5	-	-	-	-
	35	5	2	3	-	-	-	-
	36	5	-	5	-	-	-	-
Total...		100	62	23	4	5	4	2

T A B L A X X V

Cepas de las diversas especies en los velos formados sobre vinos del Aljarafe y El Condado.

Nº del mosto	Cepas de cada mosto	<i>Saccharomyces beticus</i>	<i>Saccharomyces montuliensis</i> ..	<i>Candida mycoderma</i>	<i>Saccharomyces cheresiensis</i> ...	<i>Saccharomyces rouxi</i>
37	5	4	-	-	1	-
38	5	5	-	-	-	-
39	5	2	-	3	-	-
40	5	5	-	-	-	-
41	5	5	-	-	-	-
42	5	5	-	-	-	-
43	5	5	-	-	-	-
44	5	5	-	-	-	-
45	5	4	1	-	-	-
46	5	3	1	-	1	-
47	5	1	4	-	-	-
48	5	2	3	-	-	-
49	5	-	-	5	-	-
Total..	65	46	9	8	2	-

T A B L A XXVI

Frecuencia de las especies capaces de formar velo en las distintas comarcas.
Su poder fermentativo y producción de acidez volátil.

Comarca	ESPECIES AISLADAS	Mostos en que se aisló la especie	Porcentaje	Nº de cepas aisladas	Porcentaje	Alcohol (g)		Ac. volátil g/l	
						Máxima	Mínima	Máxima	Mínima
Montilla	<i>Saccharomyces cheresiensis</i> ..	10	62,5	38	47,5	18,0	14,2	2,26	0,61
	<i>Saccharomyces rouxi</i>	8	50,0	35	43,8	18,2	14,0	1,84	1,04
	<i>Saccharomyces beticus</i>	4	25,0	6	7,5	18,0	17,0	0,98	0,61
	<i>Saccharomyces montuliensis</i> ..	1	6,2	1	1,2	16,0	16,0	1,22	1,22
Jerez	<i>Saccharomyces beticus</i>	14	70,0	62	62,0	15,6	11,9	1,32	0,60
	<i>Hansenula anomala</i>	5	25,0	23	23,0	4,4	2,5	0,66	0,44
	<i>Saccharomyces montuliensis</i> ..	2	10,0	4	4,0	13,7	13,1	0,98	0,76
	<i>Saccharomyces cheresiensis</i> ..	2	10,0	4	4,0	13,7	13,1	0,98	0,60
	<i>Saccharomyces rouxi</i>	2	10,0	2	2,0	13,1	11,9	1,10	0,93
	<i>Zigosacch. acidifaciens</i>	1	5,0	5	5,0	8,7	7,5	0,60	0,38
	<i>Saccharomyces beticus</i>	12	92,3	46	70,8	15,0	11,2	1,43	0,71
Aljarafe Condeado.	<i>Saccharomyces montuliensis</i> ..	4	30,8	9	13,8	13,7	11,9	1,21	0,82
	<i>Candida mycoderma</i>	2	15,4	8	12,3	5,0	2,5	0,76	0,60
	<i>Saccharomyces cheresiensis</i> ..	2	15,4	2	3,1	12,5	12,5	1,21	0,82
	<i>Saccharomyces rouxi</i>	1	15,4	1	1,2	12,5	12,5	1,21	0,82

TABLA XXVII

Cuadro comparativo de la distribución de las levaduras de velo en Andalucía Occidental.- Porcentaje de frecuencia.

ESPECIES	Montilla	Jerez	Condado y Aljarafe.
<i>Saccharomyces beticus</i>	25	70	92
<i>Saccharomyces cheresiensis</i> .	62	10	15
<i>Saccharomyces rouxi</i>	50	10	0
<i>Saccharomyces montuliensis</i> .	6	10	31
<i>Candida mycoderma</i>	0	0	15
<i>Zigosaccharomyces acidifaciens</i> ..	0	5	0
<i>Hansenula anomala</i>	0	25	0

SELECCION DE CEPAS PARA USO INDUSTRIAL

En los vinos de Montilla-Los Moriles, una vez ~~e~~ concluida la fermentación de los mostos, aparece una - flora filmógena constituida por levaduras, que como hemos visto en la de la Segunda Parte, pertenecen a cuatro especies distintas; ésto plantea varios problemas.- ¿Todas estas especies intervienen en la crianza biológica a que estos vinos son sometidos posteriormente?. ¿Todas las levaduras que pueden intervenir en la crianza, son adecuadas para tal fin?, y estas especies, que no intervienen en la fermentación espontánea como se ha visto en el estudio microbiológico de las mismas ¿pueden ser utilizadas para llevar a cabo la fermentación controlada de dichos mostos, ya que están dotadas de alto poder fermentativo?.

Para tratar de poner en claro estas cuestiones, ha sido necesario abordar de manera sistemática el estudio detallado de la fisiología de cada una de estas especies al desarrollar, primero en mosto de uva y después sobre vino de una concentración alcohólica más alta, en las mismas condiciones usadas en la industria.

Para obtener una visión de conjunto hemos considerado aquellas levaduras que se nos presentan con gran predominio en esta zona, junto a otras que tienen el mismo carácter en la zona de Jerez así como otras especies que en Jerez llegan a adquirir cierta importancia y que nunca hemos aislado en la zona objeto de nuestro

estudio.

Para ello se han estudiado como agentes de fermentación sobre mostos de uva estéril, pudiéndose afirmar que las cuatro especies aisladas en los velos de - Montilla-Los Moriles, pertenecientes al género Saccharomyces (rouxii, montuliensis, beticus y cheresienses), - son las que, dotadas de alto poder fermentativo, pueden ser utilizadas para concluir la fermentación, desarrollando con gran facilidad sobre vino de 15° y por tanto son las que intervienen efectivamente en la crianza posterior del vino.

Se ha hecho un estudio detenido de estas cuatro especies junto a otras, también del género Saccharomyces, aisladas en fase fermentativa, únicamente con el - objeto de establecer una confrontación que nos permita deducir sobre su posible empleo como agentes de fermentación. De los resultados obtenidos se deduce que, indudablemente, pueden ser empleadas como tales.

Para aclarar la segunda cuestión, fué preciso - seguir la evolución de un vino sembrado en pureza con - cada una de las especies de levadura de flor. A partir de los datos obtenidos, puede afirmarse que existen especies, entre las estudiadas, que por su rápido consumo de etanol o por su escasa producción de acetaldehído, - son menos interesantes que aquellas en las que estos índices alcanzan valores más elevados y tienen por tanto, mayores posibilidades aplicativas.

Por último, y dado el interés esencialmente apli
cativo que se imprime a este trabajo, hemos escogido -
aquellas cepas que presentan un positivo valor tanto pa-
ra efectuar una vinificación como para someter a un vino
a crianza.

IIa.- ESTUDIO DE LAS LEVADURAS FILMOGENAS Y NO FILMOGENAS A 15° ALCOHOLICOS, COMO AGENTES DE FERMENTACION.

Para realizar este estudio se utilizaron las siguientes cepas:

<u>Cepa (x)</u>	<u>Especie</u>	<u>Agente</u>
V-1	Saccharomyces cheresiensis	Crianza
V-2	Saccharomyces cheresiensis	Crianza
V-3	Saccharomyces cheresiensis	Crianza
V-5	Saccharomyces cheresiensis	Crianza
V-7	Saccharomyces cheresiensis	Crianza
V-24	Saccharomyces cheresiensis	Crianza
V-4	Saccharomyces rouxi	Crianza
V-6	Saccharomyces montuliensis	Crianza
V-20	Saccharomyces montuliensis	Crianza
V-21	Saccharomyces béticus	Crianza
V-10	Hansenula anomala	Filmógena
V-12	Zigosacch. acidifaciens	Filmógena
V-15	Saccharomyces mangini	Fermentación
V-16	Saccharomyces mangini	Fermentación
V-17	Saccharomyces oviformis	Fermentación
V-18	Saccharomyces oviformis	Fermentación
V-22	Saccharomyces ellipsoideus	Fermentación
V-23	Saccharomyces ellipsoideus	Fermentación

(x) La numeración corresponde a la Colección del Departamento de Fermentaciones Industriales del P.J.C.

Se sembraron estas cepas, previamente rejuvenecidas sobre agar-malta, en mosto de uva estéril y de - las siguientes características:

Glucosa	36,6%
Acidez total	3,4 gr/l en Ao. tartárico
Acidez volátil	0,16 gr/l en Ao. acético

Una vez concluida la fermentación, se realizaron una serie de análisis conducentes a determinar los índices más característicos del vino obtenido y por su evolución, el metabolismo de la levadura en cuestión.

Estos análisis son alcohol, acidez volátil, acidez total, acetaldehído, azúcares reductores, ácido láctico y glicerina según las técnicas anteriormente indicadas.

Los resultados obtenidos vienen expuestos en - las Tablas siguientes.

TABLA XXVIII

ALCOHOL OBTENIDO Y AZUCAR NO FERMENTADO

<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>	<u>Grados</u>	<u>Gra/l azúcar</u>	<u>Consumo gr azúcar por g Alcohol.</u>
V-1	S. cheresiensis	15,9	62,0	19,11
V-2	S. cheresiensis	15,5	69,0	19,16
V-3	S. cheresiensis	15,2	76,0	19,07
V-5	S. cheresiensis	16,1	49,0	19,68
V-7	S. cheresiensis	17,3	37,0	19,01
V-24	S. cheresiensis	16,5	44,0	19,51
V-4	S. rouxii	15,8	72,0	18,60
V-6	S. montuliensis	18,3	15,0	19,18
V-20	S. montuliensis	18,5	0,5	19,75
V-21	S. béticus	16,0	61,0	19,06
V-10	H. anómala	3,8	217,0	38,21
V-12	Z. acidifaciens	8,2	146,0	26,82
V-15	S. mangini	15,5	63,0	19,54
V-16	S. mangini	15,7	37,0	20,95
V-17	S. oviformis	17,0	38,0	19,29
V-18	S. oviformis	16,1	56,0	19,25
V-22	S. ellipsoideus	15,5	53,0	20,19
V-23	S. ellipsoideus	17,0	37,0	19,35

Todas estas levaduras se nos muestran como altamente alcoholígenas, salvo las cepas de Hansenula anomala y Zigosaccharomyces acidifaciens, con matices cuantitativos diferenciables, propios de las distintas especies. No obstante, destacan las cepas de Saccharomyces montuliensis por su elevada producción de alcohol y consumiendo menos azúcar la primera de ellas, aunque el mejor aprovechamiento de glucosa para producir etanol está a cargo de la cepa de Saccharomyces rouxii, el cual consume 18,6 gramos por grado de alcohol obtenido pero deja un residuo azucarado de importancia, de aquí que presente más valor para la vinificación la cepa V-20, - de Saccharomyces montuliensis que produce alcohol con inferior rendimiento pero es capaz de resistir mayores concentraciones de él, consumiendo, prácticamente, toda la glucosa y produciendo por tanto, un vino de mayor graduación alcohólica y menor residuo azucarado, factores de gran importancia y que han de ser considerados antes de someter un vino a crianza.

En general, haciendo excepción de las cepas V-10 y V-12 que no son agentes de crianza como tendremos ocasión de ver, resultan más favorables los valores obtenidos con las cepas de crianza que con las de fermentación como puede apreciarse en los valores medios de grados alcohólicos obtenido y azúcar consumido.

	<u>GRADO MEDIO</u>	<u>RAZON MEDIA GR.- AZUCAR/2 ALCOHOL.</u>
Agentes Crianza	16,51	19,21
Agentes Ferment.	16,13	19,76

En efecto, los agentes de crianza al fermentar - un mosto producen mayor cantidad de alcohol y menor consumo de azúcar que los propios agentes de fermentación.

Por lo que a las especies *Hansenula anomala* y *Zigosaccharomyces acidifaciens* respecta, es interesante hacer notar que no se ha aislado ninguna cepa de ellas en los velos de Montilla y Los Moriles, mientras que en Jerez (36) llegan a adquirir cierta importancia. Este hecho se debe a que, en general, las cepas causantes de la fermentación espontánea en la región de Montilla-Los Moriles tienen un poder fermentativo superior a las cepas de idénticas especies aisladas en Jerez y esto, unido a la mayor riqueza en azúcar de los mostos que en ella se producen, hace que los vinos obtenidos sean de superior graduación alcohólica que los que se obtienen en la región jerezana, con lo que estas especies no desarrollan por ser incapaces de hacerlo por encima de una concentración alcohólica de 12 grados.

TABLA XXIX

ACIDEZ TOTAL Y ACIDEZ VOLÁTIL.

<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>	<u>Acidez total en gr.tartárico/l.</u>	<u>Acidez volátil en gr.acético/l</u>
V-1	S. cheresiensis	4,6	1,68
V-2	S. cheresiensis	5,8	1,71
V-3	S. cheresiensis	5,2	1,45
V-5	S. cheresiensis	4,6	1,44
V-7	S. cheresiensis	4,4	1,60
V-24	S. cheresiensis	4,9	1,70
V-4	S. rouxi	4,8	1,78
V-6	S. montuliensis	4,2	0,66
V-20	S. montoliensis	4,8	1,54
V-21	S. béticus	4,9	1,92
V-10	M. anómala	4,4	0,42
V-12	Z. acidifaciens	5,1	0,48
V-15	S. mangini	4,7	1,10
V-16	S. mangini	4,0	0,96
V-17	S. oviformis	4,0	0,84
V-18	S. oviformis	4,2	0,96
V-22	S. ellipsoideus	4,3	1,20
V-23	S. ellipsoideus	4,1	0,96

Se aprecia en esta Tabla XXIX, que la producción de acidez volátil por las especies de levaduras aisladas en la tercera fase fermentativa es inferior a la producida por las levaduras de crianza a pesar de que en este mosto tan concentrado en glucosa, aquellas especies resultan más acetígenas que si fermentan en mostos con menos glucosa, al igual que ocurre en la producción de alcohol.

En efecto, los valores medios obtenidos son:

	Acidez volátil media <u>en gramos acético/l.</u>
Agentes de Crianza	1,55
Agentes de Ferment.	1,00

Esta diferencia de 0,55 gramos por litro, presenta gran importancia y hace preferible el uso de los agentes de fermentación en la obtención de un vino que no sea destinado a la "crianza" posterior, pues aunque éstos son capaces de producir menor cantidad de alcohol que los agentes de crianza, la diferencia -0,38° de alcohol- no es muy elevada y en conjunto presenta más valor

la menor producción de acidez volátil que esa concentración alcohólica más elevada.

Esto, como decimos, en cuanto se refiere a un vino que no va a ser sometido a crianza, pero si el vino va a ser sometido a este proceso, entonces los agentes de crianza si pueden perfectamente ser utilizados en la fermentación, ya que la acidez volátil producida con exceso es metabolizada por estas mismas levaduras desde el momento en que empieza a aparecer el "velo" hasta caer en valores muy bajos, normales, como veremos más adelante. Unida esta particularidad al hecho, visto precedentemente, de ser capaces de producir más alcohol y con mejor rendimiento que los propios agentes de fermentación, los hace especialmente adecuados para la fermentación de un mosto y posterior crianza del vino obtenido.

En cuanto a la producción de glicerina y ácido láctico, sus valores, recogidos en la Tabla XXX, indican la mayor capacidad por parte de las levaduras de "crianza" para originarlos, capacidad mucho más elevada que la que poseen los agentes de fermentación y que puede comprobarse en el Cuadro siguiente que recoge los valores medios de unos y otros agentes:

	Glicerina Valor medio <u>en gramos/l</u>	Ac. láctico Valor medio <u>en gramos/l</u>
Agentes de Crianza	10,25	0,833
Agentes de Ferment.	6,05	0,52

Destaca el hecho de que las cepas de *Hansenula anomala* y el *Zigosaccharomyces acidifaciens* se muestran totalmente incapaces de producir ácido láctico y con poca capacidad para la producción de glicerina, aunque en este aspecto son aventajadas por las dos cepas de *Saccharomyces mangini*, con una producción media de 0,8 gramos por litro.

TABLA XXX

PRODUCCION DE GLICERINA Y ACIDO LACTICO

<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>	<u>Glicerina gramos/l.</u>	<u>Ac. láctico gramos/l.</u>
V-1	S. cheresiensis	10,7	0,88
V-2	S. cheresiensis	10,5	1,20
V-3	S. cheresiensis	10,2	1,10
V-5	S. cheresiensis	10,3	0,83
V-7	S. cheresiensis	6,0	0,80
V-24	S. cheresiensis	13,4	0,45
V-4	S. rouxii	10,2	1,10
V-6	S. montuliensis	8,3	0,91
V-20	S. montuliensis	10,0	0,72
V-21	S. béticus	12,9	0,34
V-10	H. anómala	2,8	—
V-12	Z. acidifaciens	2,7	—
V-15	S. mangini	1,28	0,27
V-16	S. mangini	0,55	0,50
V-17	S. oviformis	8,5	0,72
V-18	S. oviformis	7,1	0,72
V-22	S. ellipsoideus	9,7	0,50
V-23	S. ellipsoideus	9,2	0,43

Una vez detallados todos los análisis realizados, y comparados los resultados obtenidos para los agentes de fermentación y los agentes de crianza, cabe afirmar, que los agentes de crianza, son especialmente indicados, no solo para concluir una fermentación eliminando totalmente los restos de azúcares fermentescibles, sino también para emplearlos en la fermentación total del mosto de uva cuando el vino obtenido quiera someterse a "crianza" ya que entonces se obtiene un vino con unos caracteres mucho más adecuados a este fin que cuando la vinificación se lleva a cabo con los agentes de fermentación.

De entre todas las cepas estudiadas, todas se nos muestran como muy aprovechables para su aplicación industrial aún cuando destaquen las cepas de *Saccharomyces mentuliensis* por su elevada capacidad alcoholígena y su no—muy elevada producción de acidez volátil.

IIB.- ESTUDIO DE LAS LEVADURAS FILMOGENAS
A 15º ALCOHOLICOS, EN FASE DE VELO.

Para iniciar este estudio se toman en considera
ción las mismas cepas de levaduras filmógenas estudia-
das anteriormente.

Para ello, y a partir de una "estria" en agar-
malta, se siembra cada una de ellas en un matraz erlen-
meyer de 100 c.c. de capacidad conteniendo 50 c.c. de -
vino de Jerez; este vino fué esterilizado previamente -
por filtración amicrobica y tenía los siguientes valo-
res analíticos:

Alcohol	13,9 grados
Acidez total	3,80 gr/l en ac. tartárico
Acidez volátil	0,78 gr/l en ac. acético
Acido láctico	0,90 gr/l
Acetaldehído	0,05 gr/l
Materia reductora	0,50 gr/l
Glicerina	7,45 gr/l

Transcurridos 8-10 días, la aparición de velo tu
vo lugar en las cepas pertenecientes a las levaduras in-
dicadas en la Tabla XXXI.

TABLA XXXI

DESARROLLO DE VELO

<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>	<u>Desarrollo</u>
V-1	S. cheresiensis	+
V-2	S. cheresiensis	+
V-3	S. cheresiensis	+
V-5	S. cheresiensis	+
V-7	S. cheresiensis	+
V-24	S. cheresiensis	+
V-4	S. rouxii	+
V-6	S. montuliensis	+
V-20	S. montuliensis	+
V-21	S. beticus	+
V-10	M. anómala	-
V-12	Z. acidifaciens	-
V-15	S. mangini	-
V-16	S. mangini	-
V-17	S. oviformis	-
V-18	S. oviformis	-
V-22	S. ellipsoideus	-
V-23	S. ellipsoideus	-

Cabe pues aseverar, que tanto la *Hansenula anomala* como el *Zigosaccharomyces acidifaciens*, que son capaces de formar velo sobre vinos de bajo graduación, no se pueden en realidad calificar como agentes de crianza ya que son incapaces de desarrollar en medios con contenido alcohólico alrededor de los 14 grados, que es el caso de todos los vinos sometidos a crianza, tanto en la región jerezana como en Montilla y Los Moriles.

En cuanto a las especies *Saccharomyces mangini*, *Saccharomyces oviformis* y *Saccharomyces ellipsoideus*, - es evidente que tampoco son capaces de formar velo, ni aún en medios con menor contenido alcohólico, tal como se vió en la Primera Parte y que concuerda perfectamente con el hecho de que nunca hayan sido aisladas en la fase de velo.

Así pues, escogimos para proseguir este estudio aquellas levaduras que tienen desarrollo de velo en estas condiciones y que son las indicadas con el signo positivo en la Tabla XXXI y calificadas como agentes de crianza por cuanto este concepto lleva implícito la capacidad de filmógenas.

A partir de los velos obtenidos en los matraces erlenmeyer de 100 c.c. se recoge una pequeña fracción - que se pasa en condiciones asépticas, a matraces erlenmeyer de 500 c.c. conteniendo cada uno 250 c.c. del mismo vino de Jerez anteriormente indicado.

Por cada cepa se siembran cuatro matraces. Cada matraz se utiliza como muestra pura para llevar a cabo un análisis completo a distintos intervalos de tiempo.- Sobre la primera a los 10 días de cubierta totalmente - la superficie del vino por el velo; la segunda, un mes después de analizada la primera; la tercera a los 15 - días de analizada la segunda y la cuarta a los dos meses y medio de la tercera, transcurriendo en total cuatro meses del primero al último análisis.

Los análisis realizados son los ya indicados anteriormente así como las técnicas seguidas.

De este modo se sigue la evolución de los distintos valores analíticos del vino en cuestión por obra de cada levadura, pudiéndose de este manera precisar - aquélla o aquéllas levaduras que presenten un carácter aplicativo de interés industrial, y pudiéndose desechar aquellas que, por presentar un metabolismo desfavorable sean inadecuadas a tal fin.

Los análisis realizados se indican en las Tablas que siguen, indicando en cada caso los valores obtenidos en las distintas muestras, así como la producción o consumo total para el producto considerado y por cada cepa.

Puede decirse que son los análisis realizados sobre las tres primeras muestras los que presentan un positivo interés en cuanto a las consideraciones que pueden de ellos deducirse, ya que como veremos, es en el intervalo de tiempo que comprenden estos análisis cuando tie-

nen lugar los más profundos cambios metabólicos, pero - se ha considerado también interesante el realizar el - cuarto análisis, ya a los dos meses y medio del tercero, con objeto de poner de manifiesto de forma acusada la - característica fisiológica de cada una de las cepas pue^s tas en estudio.

Recoge la Tabla XXXII los datos referentes al - consumo de alcohol. Dos de las cepas empleadas se nos - muestran con un consumo alcohólico mínimo, son la V-3 y la V-20 pertenecientes a las especies *Saccharomyces cheresiensis* y *Saccharomyces montuliensis*, que solo consu - men 1,5 y 2,0 grados sobre el consumo del testigo, res - pectivamente. En sentido contrario se distinguen dos ce - pas de *Saccharomyces cheresiensis*, la V-2 y la V-24 con un consumo sobre el testigo del 3,1²; estos resultados - son confirmados por el cuarto análisis, en efecto: los - valores alcanzados por estas cepas son los máximos en - uno y otro sentido, aunque ya en el intervalo de tiempo que media entre uno y otro análisis otras levaduras al - canzan valores iguales.

T A B L A XXXII

CONSUMO DE ALCOHOL

<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>	<u>1º</u>	<u>2º</u>	<u>3º</u>	<u>4º</u>	<u>Total</u>
	Testigo	12,8	11,9	10,9	7,1	6,7
V-1	S. cheresiensis	12,0	9,3	8,2	3,3	10,5
V-2	S. cheresiensis	12,3	9,5	7,8	2,7	11,1
V-3	S. cheresiensis	12,2	10,5	9,4	3,8	10,0
V-5	S. cheresiensis	9,9	10,3	8,0	3,8	10,0
V-7	S. cheresiensis	10,0	9,6	8,3	2,7	11,1
V-24	S. cheresiensis	12,0	9,1	7,8	2,7	11,1
V-4	S. roumii	12,4	9,3	8,4	3,8	10,0
V-6	S. montuliensis	10,3	8,5	8,0	2,8	11,0
V-20	S. montuliensis	12,2	10,3	8,9	3,9	9,9
V-21	S. beticus	11,8	9,6	8,1	2,8	11,0

Los valores corresponden a grados alcohólicos

La producción y posterior consumo del acetaldehido viene indicado en la Tabla XXXIII. Salvo en tres casos, que por otro lado no se acusan en el cuarto análisis, puede afirmarse que la producción de acetaldehido es simultánea con la aparición del velo. En efecto, es en la primera muestra, examinada a los diez días de cubrir el "velo", donde las concentraciones de acetaldehido son mayores; destaca en este sentido la cepa de *Saccharomyces rouxii*, la V-4, con 857,0 miligramos por litro seguida de la V-3 de *Saccharomyces cheresiensis* con 819 miligramos. Ahora bien, el acetaldehido es rápidamente consumido como lo demuestra el que ya el segundo análisis presente valores muy inferiores y que son muy parecidos a los del tercer análisis, con lo que parece indicarse que ya se mantiene en estos valores pues aún en el cuarto análisis se presentan valores muy elevados, destacando la cepa V-20 de *Saccharomyces montuliensis* con 228 miligramos por litro. Se deduce, pues que el mayor consumo de etanal tiene lugar en el intervalo de un mes que media entre el primero y segundo análisis.

El comportamiento de la acidez volátil presenta un notable contraste con los valores, ya expuestos, del acetaldehido. En efecto, en la Tabla XXXIV puede observarse, como los valores de la primera muestra han disminuido sensiblemente con respecto al valor del tes

tigo, mientras que es en esta muestra cuando tiene lugar la extraordinaria producción de acetaldehído; los términos se invierten en la segunda muestra, mientras que la acidez volátil sufre un gran incremento, el etanal disminuye notablemente. En la tercera muestra analizada, los valores de esta acidez han disminuido nuevamente, en general, hasta llegar a valores sensiblemente inferiores en la cuarta muestra analizada, destacando en este sentido las tres cepas de *Saccharomyces cheresiensis* V-1, V-2 y V-3 que llegan a consumir cada una 0,55 gramos por litro de acidez volátil, expresada en ácido acético. De aquí, el que se pueda efectuar una vinificación de un mosto que posteriormente va a ser sometido a "crianza", con cualquiera de estas cepas, ya que, como vimos en la IIa.- precedente, aunque estas cepas produzcan mayor concentración de acidez volátil, también la consumen con gran rapidez, dejando el vino con unos valores de "volatil" totalmente normales y adecuados para su consumo.

Es de destacar el hecho de que solo la cepa V-3 de *Saccharomyces cheresiensis* es capaz de ir disminuyendo de modo constante la acidez volátil sin sufrir en ninguna de las muestras un incremento, como ocurre con todas las demás cepas estudiadas.

T A B L A XXXIII

PRODUCCION DE ACETALDEHIDO.

<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>	<u>1º</u>	<u>2º</u>	<u>3º</u>	<u>4º</u>
	Testigo	50,3	41,2	30,7	19,3
V-1	S. cheresiensis	494,4	431,5	471,1	143,6
V-2	S. cheresiensis	510,0	278,4	233,8	133,7
V-3	S. cheresiensis	819,0	396,0	361,8	105,5
V-5	S. cheresiensis	140,0	391,5	409,6	116,1
V-7	S. cheresiensis	106,0	756,6	655,4	110,8
V-24	S. cheresiensis	399,5	273,1	223,6	104,2
V-4	S. rouxii	857,0	524,0	423,3	116,1
V-6	S. montuliensis	276,3	464,5	327,7	112,6
V-20	S. montuliensis	533,0	360,0	343,1	228,0
V-21	S. beticus	604,3	520,0	341,4	151,3
					<u> </u>
					- 31,0
					+ 93,3
					+ 83,4
					+ 55,2
					+ 65,8
					+ 60,5
					+ 53,9
					+ 65,8
					+ 61,3
					+177,7
					+101,0

Los valores corresponden a miligramos de acetaldehido por litro de vino.

T A B L A XXXIV

EVOLUCION DE LA ACIDEZ VOLATIL

<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>	<u>1º</u>	<u>2º</u>	<u>3º</u>	<u>4º</u>	<u>Pérdida</u>
	Testigo	0,9	0,72	0,72	0,71	0,00
V-1	S. cheresiensis	0,30	2,3	0,52	0,23	0,55
V-2	S. cheresiensis	0,24	0,43	0,28	0,23	0,55
V-3	S. cheresiensis	0,42	0,28	0,21	0,23	0,55
V-5	S. cheresiensis	0,24	0,21	2,5	0,35	0,45
V-7	S. cheresiensis	0,30	1,22	0,72	0,30	0,48
V-24	S. cheresiensis	0,36	0,36	0,21	0,30	0,48
V-4	S. rauxii	0,54	2,50	1,00	0,35	0,45
V-6	S. montuliensis	0,42	2,30	0,86	0,41	0,37
V-20	S. montuliensis	0,24	2,16	0,64	0,41	0,37
V-21	S. beticus	0,30	0,64	0,21	0,30	0,48

Los valores corresponden a gramos de ácido acético por litro de vino.

Representamos en la Tabla XXXIV el consumo de gli
cerina durante el tiempo de la experiencia y por cada -
una de las cepas de las distintas especies puestas en es
tudio y con relación al consumo del testigo. Destaca el
hecho de que todas las cepas metabolizan con gran rapi -
dez la glicerina, y que esta metabolización, salvo en -
dos casos, alcanza sus mayores cifras en los diez prime -
ros días como lo demuestran los valores de la primera -
muestra analizada. En este tiempo consumen 3, 4 y hasta
5 gramos por litro, para seguir un consumo inferior en -
tre la primera y segunda muestra y mantenerse práctica -
mente constante a partir de la tercera muestra. Sobresa
le la cepa V-6 de Saccharomyces montuliensis que ya en -
los diez primeros días consume 6,07 gramos, sin que ya -
sea capaz de consumir más en el tiempo que duró la expe -
riencia, ya que da como valor final un valor prácticamen
te igual al de la primera muestra.

Por lo que a los valores de ácido láctico respec
ta, recogidos en la Tabla XXXVI, cabe destacar que prácti
camente no sufren evolución alguna, salvo en un caso, -
ya que las pequeñísimas variaciones obtenidas bien pue -
den imputarse al método analítico utilizado. Todas las
muestras conservan en el cuarto análisis el valor que te
nía el testigo utilizado y solo la cepa V-20 de Saccharo
myces montuliensis es capaz de consumir una pequeña frac
ción del ácido láctico.

T A B L A X X V

CONSUMO DE GLICERINA.

<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>	<u>1º</u>	<u>2º</u>	<u>3º</u>	<u>4º</u>	
	Téstigo	7,45	7,7	7,4	8,0	+ 0,55
V-1	S. cheresiensis	4,25	2,02	2,0	1,74	- 5,71
V-2	S. cheresiensis	3,06	0,82	1,8	1,65	- 5,80
V-3	S. cheresiensis	5,52	2,92	1,8	1,65	- 5,80
V-5	S. cheresiensis	3,58	4,9	1,7	1,56	- 5,89
V-7	S. cheresiensis	3,68	2,04	1,76	1,65	- 5,80
V-24	S. cheresiensis	2,48	1,24	1,85	1,65	- 5,80
V-4	S. rouxii	5,7	2,11	1,8	1,65	- 5,80
V-6	S. montuliensis	1,38	1,24	1,1	1,56	- 5,89
V-20	S. montuliensis	3,27	1,10	0,9	1,65	- 5,80
V-21	S. beticus	3,27	0,82	1,9	1,74	- 5,71

Los valores corresponde a gramos de glicerina por litro de vino.

T A B L A XXXVI

Evolución del ácido láctico

<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>	<u>1º</u>	<u>2º</u>	<u>3º</u>	<u>4º</u>	
	Testigo	0,9	1,0	1,0	1,0	+ 0,1
V-1	S. cheresiensis	0,81	1,10	1,0	1,0	+ 0,1
V-2	S. cheresiensis	0,90	0,87	0,81	0,81	- 0,09
V-3	S. cheresiensis	0,81	0,80	0,96	0,90	0,0
V-5	S. cheresiensis	0,90	0,87	0,87	0,90	0,0
V-7	S. cheresiensis	0,90	0,95	0,95	0,99	+ 0,09
V-24	S. cheresiensis	0,99	0,70	0,89	0,99	+ 0,09
V-4	S. rouxii	0,81	1,00	0,87	0,99	+ 0,09
V-6	S. montuliensis	0,87	0,87	0,87	0,87	- 0,03
V-20	S. montuliensis	0,90	0,80	0,80	0,62	- 0,28
V-21	S. beticus	0,54	0,84	0,84	0,89	- 0,01

Los valores corresponden a gramos de ácido láctico por litro de vino

En la Tabla XXXVII exponemos los valores concier-
nientes a la acidez total. Destaca el hecho, al igual
que ocurría con el ácido láctico, que los valores se -
mantienen prácticamente constantes, sin sufrir consumo
ni elevación alguna. Aunque si es posible apreciar que
en la primera muestra analizada todos los valores resul-
tan inferiores al valor que presenta el testigo, con lo
que parece deducirse que hay un pequeño consumo en los
primeros tiempos de aparición del velo, sin embargo, es-
tos valores se van incrementando, en pequeña cuantía -
desde luego, hasta alcanzar los que primitivamente pre-
senta el testigo, quizás por aparecer otros ácidos du-
rante el metabolismo celular y que posteriormente son -
valorados como "acidez total".

T A B L A XXXVII

EVOLUCION DE LA ACIDEZ TOTAL.

<u>Cepas</u>	<u>Especie</u>	<u>1º</u>	<u>2º</u>	<u>3º</u>	<u>4º</u>	
	Testigo	3,8	3,9	3,9	4,4	+ 0,6
V-1	S.cheresiensis	2,9	4,2	3,8	3,1	- 0,7
V-2	S.cheresiensis	3,0	3,1	3,3	3,7	- 0,1
V-3	S.cheresiensis	3,0	3,1	3,0	3,6	- 0,2
V-5	S.cheresiensis	2,9	2,9	4,5	3,6	- 0,2
V-7	S.cheresiensis	2,9	4,3	3,7	3,4	- 0,4
V-24	S.cheresiensis	3,1	3,3	3,0	3,8	0,0
V-4	S.rouxii	3,2	4,5	3,9	3,6	- 0,2
V-6	S.montuliensis	3,3	4,1	3,9	4,0	+ 0,2
V-20	S.montuliensis	3,0	4,2	3,2	4,0	+ 0,2
V-21	S.beticus	3,0	3,5	3,1	3,6	- 0,2

Los valores corresponden a gramos de ácido tartárico por litro de vino.

Por tanto, y como resumen de todos los valores obtenidos en los distintos análisis, puede verse que - en la primera fase de la evolución del vino, es decir la aparición del velo, se presentan un rápido consumo de etanol, glicerina y acidez volátil, con un consumo muy moderado de acidez total, en tanto que se producen grandes cantidades de acetaldehído en concentraciones variables según la capacidad propia de cada cepa. Luego, este acetaldehído es también consumido a la vez - que aparece un notable aumento de acidez volátil, mientras que el consumo de glicerina y etanol continua. Finalmente, entre la tercera y cuarta muestra, continua el rápido consumo de alcohol, mientras que los consu- mos de glicerina, y acetaldehído se atemian, especialmente el de glicerina que continua en la cuarta muestra con valores prácticamente iguales a los de la tercera. Con respecto a la acidez total, sus valores se elevan, hasta alcanzar en la tercera y sobre todo, en la cuarta muestra, unos valores muy ligeramente superiores a los del vino utilizado como testigo, mientras que la - acidez volátil es consumida también en gran cuantía y llega a valores muy inferiores a los del testigo.

De todo esto cabe deducir que para llevar a cabo la "crianza" de un vino puede utilizarse una espe- cie pura que presente más ventajas que una flora mixta espontánea, dado las diferencias que hemos podido ob -

servar en el consumo de etanol, glicerina y producción de acetaldehído, por ejemplo.

En nuestro estudio, se pretendía seleccionar - las cepas que presentasen mayor interés aplicativo. Todas las estudiadas lo presentan indudablemente, ya que fueron seleccionadas a la vista de sus poderes fermentativos y producción de acidez volátil obtenidos al hacer su clasificación sistemática, pero ahora, una vez que se cuenta con la serie de datos que nos dan los análisis realizados, podemos efectuar una nueva selección entre éstas y así destacan las cepas V-3 de *Saccharomyces cheresiensis*, la V-4 de *Saccharomyces rouxii* y la V-20 de *Saccharomyces montuliensis* por el conjunto de sus características, como las más indicadas para su uso enológico y que pertenecen a la Colección del Departamento de Fermentaciones Industriales del Patronato Juan de la Cierva.

CONCLUSIONES

- 1.- Han sido examinados desde el punto de vista microbiológico, 16 mostos de uva tomados en diversas localidades de la zona vitivinícola de Los Moriles - Montilla, de los que han sido aislados 240 cultivos puros de levaduras, al principio, durante el curso y al final del proceso fermentativo espontáneo.
- 2.- Todas las cepas aisladas, han sido detenidamente clasificadas y referidas a las 12 especies blastomycéticas siguientes: *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces manginii*, *Saccharomyces oviformis*, - *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces veronae*, *Torulaspora rossi*, *Torulopsis bacillaris*, *Zigosaccharomyces florentinus*, - *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora guilliermondii* y *Cándida pulcherrima*.
- 3.- De estas 12 especies de levaduras, las cinco primeras poseen un elevado poder fermentativo, las cuatro siguientes tienen un poder fermentativo medio mientras que las tres últimas gozan de escasa o - muy escasa capacidad fermentativa.
- 4.- De estas 12 especies identificadas, sólo las tres últimas no son esporigenas, hay total predominio por parte de las especies esporigenas.

- 5.- Existe un predominio casi absoluto de las cepas - pertenecientes a las especies esporigenas sobre - las cepas de especies no esporigenas, así las cepas esporigenas representan el 95% del total de - cepas aisladas. Este predominio, se acentúa a me di da que transcurre la fermentación y así, en la tercera fase fermentativa las cepas esporigenas - constituyen el 100% de las cepas aisladas, faltan do por completo las no esporigenas, que solo en - la primera fase alcanzan el 10% de las cepas ais - ladas, por lo que se puede asegurar que en ningún momento son responsables de la fermentación del - mosto de uva de esta zona.
- 6.- En todas las fases fermentativas, existe predomi - nio de las especies de elevado poder fermentativo, con la excepción del *Saccharomyces veronae*, de pe der fermentativo medio. Así, las especies de ele vado poder fermentativo, se encuentran en un 32% en la primera fase, proporción que aumenta a más del doble en la segunda fase, para llegar al 95% en la tercera.
- 7.- Todas las especies aisladas en esta zona de Montí - lla-Los Moriles tiene un poder fermentativo supe - rior a las cepas de la misma especie aisladas en - otras regiones españolas.
- 8.- Tienen la máxima importancia en la fermentación de los mostos de esta zona el *Saccharomyces ellipsoi-*

deus y el *Saccharomyces mangini*. El primero se encuentra en todas las muestras estudiadas y en las tres fases fermentativas de cada uno, creciendo su proporción al aumentar el contenido alcohólico, - desde un 15% inicial hasta llegar a constituir el 42% de las cepas aisladas en la tercera fase. Es - la especie más importante en la fermentación del - mosto. El *Saccharomyces mangini* se encuentra en - 14 de las 16 muestras examinadas, 87,5%, y también se aísla en las tres fases lo que pone de manifiesto su destacada intervención en la fermentación espontánea. El *Saccharomyces ellipsoideus* y el *Saccharomyces mangini* constituyen el 80% de las cepas aisladas en la tercera fase.

- 9.- El *Saccharomyces oviformis* aparece con mayor frecuencia en la segunda y tercera fase que en la primera y es hallado en 9 de las 16 muestras examinadas.
- 10.- En cuanto al *Saccharomyces chevalieri* y *Saccharomyces italicus*, su presencia se considera como casual dado que sólo han sido aisladas dos y una cepa respectivamente, de ellas.
- 11.- Gran interés presenta el *Saccharomyces veronae*; no tiene gran resistencia al alcohol por lo que pasa de constituir el 33% en la primera fase, al 14% en la segunda para reducirse al 4% en la fase final.-

Aparece en el 75% de las muestras examinadas, siguiendo en importancia al *Saccharomyces ellipsoideus* y al *Saccharomyces mangini*.

- 12.- La *Torulaspora rosei* aparece en el 50% de las muestras, y juntamente con el *Saccharomyces veronae* constituyen las levaduras típicas de la segunda fase dadas que las restantes levaduras de poder fermentativo medio aisladas, *Torulopsis bacillaris* y *Zigosaccharomyces florentinus*, sólo se encuentran en la primera fase, interviniendo por tanto muy poco en la fermentación.
- 13.- Apenas intervienen en la fermentación las levaduras de escaso poder fermentativo. La *Kloeckera apiculata* solo ha sido aislada en cinco muestras obteniéndose en total ocho cepas, mientras que la *Hanseniaspora guilliermondii*, aislada por primera vez en mostos de España, solo se encontró en tres muestras con un total de seis cepas. El aislamiento de una cepa de *Candida pulcherrima* lo consideramos como casual, ya que esta especie es propia de climas más húmedos.
- 14.- De la totalidad de cultivos puros aislados e identificados, en las tres fases fermentativas, se ha escogido un conjunto de cepas representativas de cada una de dichas fases que son: cepas 134, 148 y 210 de *Saccharomyces ellipsoideus*; cepas 59 y 217 de *Saccharomyces mangini*; cepas 144 y 227 de *Sac* -

charomyces oviformis; cepa 105 de Saccharomyces - itálicus; cepas 131 y 212 de Saccharomyces cheva- lieri; cepas 37 y 228 de Saccharomyces veronae; ce- pas 107 y 174 de Torulaspora rosei; cepas 155 y - 233 de Hanseniaspora guilliermondii; cepa 229 de - Kloeckera apiiculata y cepa 140 de Torulopsis baci- llaris. Con cada una de estas cepas se ha efectua- do una fermentación en pureza con mosto de uva de la siguiente composición: azúcar, 15,0 gr. Bé.; ac. total, 4,9 gr/l.; anhídrido sulfuroso total, 150,0 mgr/l.; pH, 3,4. La fermentación tiene lugar con gran rapidez salvo en los mostos sembrados con las cepas de Hanseniaspora guilliermondii, Kloeckera - apiiculata y Torulopsis bacillaris; estas son total- mente inhibidas por la dosis de anhídrido sulfuro- so, inhibición muy beneficiosa dado el metabolismo heterofermentativo de estas especies.

- 15.- La clarificación espontánea es particularmente fa- vorable con las cepas 134 de Saccharomyces ellip- soideus; 59 y 217 de Saccharomyces mangini; 227 de Saccharomyces oviformis; 131 de Saccharomyces che- valieri y 228 de Saccharomyces veronae.
- 16.- Usando como criterio selectivo el mayor rendimien- to alcohólico, la menor producción de acidez volá- til y el fermentar en presencia de 150 mgr/l de an- hídrido sulfuroso total, se escogen las cepas 134 de Saccharomyces ellipsoideus; 217 de Saccharomy-

ces mangini; 227 Sacch. oviformis y 131 de Saccharomyces chevalieri como las más indicadas para conducir una fermentación en pureza.

- 17.- También se escoge la cepa 228 de Saccharomyces veronae como la más indicada para efectuar ensayos - de fermentación escalar, dada la extraordinariamente baja producción de acidez volátil y su producción de alcohol, relativamente alta para esta especie de levadura y aparecer con mayor frecuencia - que la Torulaspora rosei en el examen microbiológico de los mostos de esta zona.
- 18.- Con las cepas indicadas en los dos últimos párrafos, se han realizado ensayos de fermentación en pureza y de fermentación escalar y cabe afirmar, - en general, la superioridad de ésta sobre la fermentación en pureza, ya que en todos los casos se obtienen vinos con mayor contenido alcohólico y menor contenido en acidez volátil utilizando las dos cepas escalarmente que en los casos en que se utiliza una sola, en pureza.
- 19.- La fermentación se desarrolla con menos actividad en los mostos sembrados escalarmente que en los sembrados en pureza pero en conjunto, la fermentación escalar tiene lugar con gran regularidad mientras que los fermentados en pureza lo hacen con gran actividad en los primeros días, pero decaen -

rápídamente y concluyen antes la fermentación pero - sin consumir en la cuantía que la fermentación escalar lo hace, los azúcares del mosto obteniéndose un rendimiento inferior en alcohol.

- 20.- En los vinos obtenidos por fermentación escalar puede observarse con respecto a los obtenidos por fermentación en pureza, menor residuo azucarado, valores para la acidez total ligeramente inferiores, mayor riqueza en ácido láctico, menor concentración de butilenglicol y acetaldehído en proporción muy ligeramente superior. Tanto los valores de acetal como los del pH son prácticamente iguales en las dos modalidades de fermentación.
- 21.- El hecho de obtenerse vinos por fermentación escalar con menor residuo azucarado así como con mayor concentración alcohólica que los que se obtienen por fermentación en pureza, reduce en aquellos el riesgo de infección bacteriana, siendo por tanto conservables, con mayor facilidad.
- 22.- A la vista de los valores obtenidos, es evidente la superioridad de la modalidad de fermentación escalar; y de todas las cepas puestas en estudio es la pareja 228-131 de *Saccharomyces veronae* y *Saccharomyces ellipsoideus*, respectivamente, la que mejor conduce una fermentación de este tipo.

SEGUNDA PARTE

- 23.- En todos los mostos examinados, y una vez concluida la fermentación alcohólica, aparece el típico "velo" formado por levaduras comúnmente conocidas como de "flor", y que comunican al vino resultante un aroma peculiar e inconfundible.
- 24.- Han sido examinados microbiológicamente los velos aparecidos en las 16 muestras de los que se han aislado y clasificado 80 cultivos puros de levaduras, referibles todos ellos a las cuatro especies blastomicéticas siguientes: *Saccharomyces béticus*, *Saccharomyces cheresiensis*, *Saccharomyces montuliensis* y *Saccharomyces rouxii*.
- 25.- Estas especies, aisladas en velos espontáneos, no se han hallado nunca entre las aisladas en las fases fermentativas y tampoco se han hallado nunca las especies propias de las fases fermentativas entre las aisladas de los velos blastomicéticos espontáneos.
- 26.- Dado que una de las cepas aisladas, cuyas principales características son fermentar únicamente la glucosa, ~~asimilar~~ únicamente también la glucosa, no ~~asimilar~~ nitratos ni escindir la arbutina, crecer sobre etanol como única fuente carbonada, poder fermentativo bastante elevado, esporificar bien sobre bloques de yeso, no coincide con ninguna de las has

ta ahora desoritas, la proponemos con el nombre de *Saccharomyces montuliensis*, en recuerdo a la localidad en que ha sido hallada por vez primera.

- 27.- El *Saccharomyces cheresiensis* es aislado en 10 de los 16 velos examinados; el *Saccharomyces rouxii* - en 8; el *Saccharomyces béticus* en 4 y el *Saccharomyces montuliensis* sólo en uno.
- 28.- El porcentaje de cepas de cada una de las especies es el siguiente: *Saccharomyces cheresiensis* 47,5%; *Saccharomyces rouxii* 43,75%; *Saccharomyces béticus* 7,5% y el *Saccharomyces montuliensis* 1,25%.
- 29.- Es interesante resaltar el que no haya sido aislada ninguna de las levaduras consideradas como perjudiciales lo que se explica por la alta graduación alcohólica natural de los vinos que se producen en esta zona.
- 30.- El poder fermentativo de las cepas identificadas es superior, al igual que ocurría a las especies aisladas en el proceso fermentativo, a las cepas de idéntica especie aisladas en otras regiones, con diferencias de hasta 4 grados en algunos casos. La producción de acidez volátil, también es superior, como es lógico, en éstas que en las aisladas en otras regiones.
- 31.- Se ha realizado con cepas de las especies de velo un estudio comparativo con especies del género *Saccharomyces* aisladas en fase fermentativa, deducción

dose que pueden aquellas ser empleadas como agentes de fermentación dado su gran poder alcoholígeno y - su gran rendimiento alcohol/azúcar y aunque su producción de acidez volátil sea superior, no es inconveniente por cuanto los vinos de esta zona son normalmente sometidos a crianza y entonces esta acidez es rápidamente consumida hasta valores normales. Esto se incrementa con el hecho de producir más glicerina, alimento de la misma levadura durante la fase de crianza.

- 32.- De entre todas las cepas estudiadas destacan las - V-6 y V-20 de *Saccharomyces montuliensis* por su elevada capacidad alcoholígena y su no muy elevada producción de acidez volátil.
- 33.- El hecho de no aislarse en los velos de esta zona - *Hansenula anomala* y *Zigosaccharomyces acidifaciens*, se debe muy probablemente, a que éstas son incapaces de desarrollarse sobre vinos con contenido alcohólico superior a los 14 grados, que es el caso de los vinos sometidos a crianza.
- 34.- Las especies *Saccharomyces mangini*, *Saccharomyces oviformis* y *Saccharomyces ellipsoideus*, tampoco forman velo en estas condiciones, ni en medios con menor contenido alcohólico, lo que concuerda con el hecho de que no hayan sido aisladas nunca en tal fase.
- 35.- Del estudio seguido con cepas de especies de crian-

za, sobre vino de graduación alcohólica 14, se deduce que en la primera fase de la evolución del vino, -la aparición de velo-, se presenta un rápido consumo de etanol, glicerina y acidez volátil, consumo moderado de acidez total y gran producción de acetaldehído. Luego, este acetaldehído es consumido a la vez que hay aumento de la acidez volátil y el consumo de glicerina y etanol continua. Finalmente, sobre los cuatro meses del desarrollo del velo, sigue el rápido consumo de etanol decayendo el de glicerina y acetaldehído. La acidez total se eleva ligeramente mientras que la volátil es consumida hasta llegar a valores muy inferiores a los del testigo.

- 36.- De todo esto puede deducirse que para llevar a cabo la crianza de un vino puede utilizarse una especie pura que presente más ventajas que una flora mixta espontánea. Como las más adecuadas para su uso enológico de las estudiadas, destacan las V-3 de *Saccharomyces oheriensis*, la V-4 de *Saccharomyces rouxi* y la V-20 de *Saccharomyces montulien-sis*.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Bidan, P.; André, L. Comunicación presentada al -
Congreso de Industrias Agrícolas. Ma-
drid 1954.
- (2) Cantarelli, C. Riv. Vit. e Enol. Conegliano. N. 3.
1953.
- (3) Cantarelli, C. Riv. Vit. e Enol. Conegliano. N. 7.
1955.
- (4) Cantarelli, C. Ann. Microb. Univ. Perugia. Vol. VI.
1955.
- (5) Campos, M. Tesis Doctoral Univ. Madrid. 1956.
- (6) Capriotti, A. Att. Acc. Ital. Vit. e Vin. Vol. V.
1953.
- (7) Capriotti, A. Biochim. Appl. 2, num. 1. 1955.
- (8) Capriotti, A. Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia. Vol. III.
1952.
- (9) Capriotti, A. Comunicación personal.
- (10) Capriotti, A. Cantarelli, C. Riv. Vit. e Enol. Co-
negliano. Num. 6-7-8. 1952.
- (11) Casas, J. Rev. Cienc. Apl. 7, num. 35, 1953.
- (12) Casas, J. Rev. Cienc. Apl. 8, num. 37, 1954.
- (13) Castelli, T. Rev. Ferm. et Ind. Alim. 7. 1952.
- (14) Castelli, T. Acc. Georgofili. Vol. III. 1956.
- (15) Castelli, T. Acc. Ital. Vit. e Vin. Vol. IV. 1952.
- (16) Castelli, T. Congr. Int. Ind. Agr. Madrid 1954.

- (17) Castelli, T. Archiv. für Mikrob., Bd. 20, S.323-342. 1954.
- (18) Castelli, T. Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia. Vol.-XI. 1955.
- (19) Castelli, T. Riv. Vit. e Enol. Conegliano, N. 4, 5. 1955.
- (20) Castelli, T. Iñigo, B. Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia. Vol. XIII. 1957.
- (21) Castelli, T.; Iñigo, B. Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia. Vol. XIII. 1957.
- (22) Cruess, W.V. Calif. Agric. Exp. Station (Berkeley) Bull. 710. 1948.
- (23) Del Giudice, E. Sicilia Agric. e Forest. N.1. 1954.
- (24) Del Giudice, E. Riv. Vit. e Enol. Conegliano. N 10-11-12. 1955.
- (25) Diddens, H.A.; Lodder, J. Die anaskosporogenen - Hefen. II Hälfte. Amsterdam 1942.
- (26) Domeroq, S. Theses Univers. Burdeos 1956.
- (27) Feduchy, E. Bol. I.N.I.A. N. 35. 1956.
- (28) Feduchy, E.; Sandoval, J.A. Bol. I.N.I.A. n. 42. 1960.
- (29) Florenzano, G. Ann. sperim. agrar. 3, 1949.
- (30) Frobisher, M. Elementos de Bacteriologia. Salvat. 1956.
- (31) Graff, Y. Rev. Ferm. e Ind. Alim; Vol. 14, 1959.
- (32) Guilliermond, A. Clef dichotomique pour le determination des levures. Le Francois. Paris 1928.

- (33) Hohl, L.H.; Cruess, W.V. Fruit Product. 20, 1940.
- (34) Iñigo, B. Rev. Ciencia Aplic. Núm. 63. 1958.
- (35) Iñigo, B.; Arroyo, V.; Ripio, R. Pendiente de Publicación.
- (36) Iñigo, B.; Arroyo, V.; Vazquez, D. Pendiente de publicación.
- (37) Iñigo, B.; Vazquez, D. Pendiente de publicación.
- (38) Iñigo, B. Vazquez, D. Microb. Españ. Vol. XII. 1959.
- (39) Inst.Nal. Estadística. Anuario. Tomo XXXIII. 1958.
- (40) Jorgensen, A.; Hansen, A. Microorganism and Fermentation. London 1948.
- (41) Lodder, J. Die anaskosporogenen Hefen. I. Hälfte. Amsterdam 1934.
- (42) Lodder, J.; Kreger -van Rijs, N.J.W. The Yeasts North Holland publ. Comp.Amsterdam 1952.
- (43) Malan, C. Acc. Ital. Vit. e Vin. Vol. III. 1951.
- (44) Marcilla, J.; Alas, G.; Feduchy, E. Anal. Centro Inv. Vin. Núm. 1. 1936.
- (45) Marcilla, J. Tratado Práctico de Viticultura y Enología Españolas. Saeta Madrid 1949.
- (46) Mareca, I. Agricultura, 315, 1958.
- (47) Marques-Gomes, J.V. Anais Inst. Vinho. Porto. 10, 51, 1949.
- (48) Peynaud, E. Rev. Ferm. e Ind. Alim. 2, 1947.
- (49) Peynaud, E.; Domercq, S. Ann. I.N.R.A. Núm. 4, 1953.
- (50) Pioci, G. Ricerca Scientifica, Núm. 2, 1955.
- (51) Prostosserdov, N.N.; Afrikian, R. Das Weiland 5, 1933

- (52) Ribereau-Gayon, J.; Peynaud, E. Ann. Inst. Pasteur 73. 1947.
- (53) Ribereau-Gayon, J.; Peynaud, E. Analyse et Contrôle des Vins. Beranger. Paris 1951.
- (54) Ribereau-Gayon, J.; Peynaud, E. Traité d'Enologie. Beranger. Paris 1960.
- (55) Rocques, X. Rev. de Viticult. 19, 1903.
- (56) Rossi, G. de. Staz. Sperim. Agrar. Ital. Vol. L. 1917.
- (57) Rossi, G. de. Microbiologia Agraria e Técnica. Reda. Roma 1959.
- (58) Stelling-Dekker N.M. Die Sporogenen Hefen Amsterdam 1931.
- (59) Verona, O. Ann. Inst. Pasteur. Tomo 82. 1952.
- (60) Verona, O. Ann. Fac. Agraria Univ. Pisa Vol. XII. 1951.
- (61) Verona, O. Acc. Ital. Vit. e Vin. Vol. III. 1951.
- (62) Verona, O. Ann. Fac. Agraria Univ. Pisa Vol. XII. 1951.
- (63) Verona, O. Picci, G. Ann. Sperim. Agraria. Roma 1954.
- (64) Verona, O. Picci, G.; Melas-Joannides, Z.; Carni I Ann. Fac. Agraria Univ. Pisa Vol. XVII. 1956.
- (65) Verona, O.; Picci, G.; Melas-Joannides, Z.; Carni I. Ann. Microb. ed Enzimologia. Vol. III. 1958.
- (66) Verona, O.; Zardetto, O. Ann. Fac. Agraria Univ. Pisa. Vol. XV. 1954.